UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOSYNTHESE VON FETTSÄUREN IN CRYPTHECODINIUM COHNII:

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER FETTSÄURE-SYNTHETASE

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

Diplom-Biologe
Ulrich Sonnenborn
aus Berleburg

Bochum 1981

UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOSYNTHESE VON FETTSÄUREN IN CRYPTHECODINIUM COHNII:

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER FETTSÄURE-SYNTHETASE

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

Diplom-Biologe
Ulrich Sonnenborn
aus Berleburg

Bochum 1981

Ein Teil der vorliegenden Arbeit wurde unter dem Titel:

"De novo Biosynthesis of Fatty Acids in the Marine Dinoflagellate Crypthecodinium cohnii : Partial Purification and Characterization of a High-Molecular Weight Fatty Acid Synthetase"

auf der Herbsttagung der Gesellschaft für Biologische Chemie, Tübingen 1979, vorgestellt.

(U. SONNENBORN & W.-H. KUNAU; Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie 360, 1196)

UNIV. LEIDEN BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 20.3.1981

Referent: Prof. Dr. W.-H. Kunau

Koreferent: Prof. Dr. W. Hengstenberg

Dekan: Prof. Dr. H.Ch. Lüttgau

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Allgemeine Aspekte der Biosynthese gesättigter und ungesättigter Fettsäuren	1
1.2.	De novo-Biosynthese gesättigter Fettsäuren	3
1.3.	Kettenverlängerung und Desaturierung der Fettsäuren	12
1.4.	Untersuchungsobjekt und Themenstellung	16
2.-	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1.	Chemikalien und Feinchemikalien	23
2.2.	Mikroorganismen	23
2.3.	Enzyme und Eichproteine	23
2.4.	Allgemeine Methoden und verwendete Geräte	24
2.4.1.	Zentrifugationen	24
2.4.2.	Leitfähigkeitsmessungen	24
2.4.3.	pH-Messungen	24
2.4.4.	Photometrische Bestimmungen	24
2.4.5.	Radioaktivitätsbestimmungen	25
2.4.6.	Gaschromatographie und Radiogaschromatographie	25
2.4.7.	Ultrafiltration	25
2.5.	Chemische Synthesen	25
2.5.1.	Darstellung von Acetyl-Coenzym A	25
2.5.2.	Tüpfeltest mit Nitroprussid-Natrium-Reagenz zum qualitativen Nachweis von freiem CoASH	26
2.5.3.	Gehaltsbestimmung von Acetyl-Coenzym A	26
2.5.4.	Darstellung von Malonyl-Coenzym A	27
2.5.5.	Gehaltsbestimmung von Malonyl-Coenzym A	27
2.6.	Proteinbestimmungen	29
2.7.	Enzymbestimmungen	31
2.7.1.	Fumarase-Test	31
2.7.2.	Catalase-Test	31
2.7.3.	Lactat-Dehydrogenase-Test (LDH-Test)	31
2.7.4.	ß-Galactosidase-Test	31
2.7.5.	2-Enoyl-CoA-Hydratase (Crotonoase)-Test (Noyes & Bradshaw, 1973)	32
2.7.6.	Protease-Bestimmung im Casein-Agar-Diffusionstest	32

		Seite
2.7.6.1.	Herstellung der Casein-Agar-Diffusionsplatten	33
2.7.6.2.	Durchführung des Proteasetests	33
2.7.6.3.	Auswertung des Proteasetests	33
2.7.7.	Bestimmung der Enzymaktivität der S.cerevisiae-FAS	34
2.7.7.1.	Radioaktiver FAS-Test	34
2.7.7.2.	Spektrophotometrischer FAS-Test	35
2.7.8.	Bestimmung der Enzymaktivität der C.cohnii-FAS	35
2.7.8.1.	Radioaktiver FAS-Test	35
2.7.8.2.	Spektrophotometrischer FAS-Test	36
2.7.9.	Bestimmung der ß-Ketoacyl-Reduktase-Teilaktivität der FAS aus S.cerevisiae	37
2.7.10.	Bestimmung der ß-Ketoacyl-Reduktase-Teilaktivität der FAS aus C.cohnii	37
2.7.11.	Bestimmung der Thioesterase-Teilaktivität der C.cohnii-FAS	38
2.8.	Radiogaschromatographische Analyse der ^{14}C-markierten Endprodukte der FAS-Reaktion	38
2.8.1.	Herstellung von Diazomethan	38
2.8.2.	Veresterung freier Fettsäuren mit Diazomethan	38
2.8.3.	Radiogaschromatographie der Fettsäuremethylester	39
2.9.	Analyse des Fettsäuremusters von Lipidextrakten	40
2.9.1.	Lipidextraktion	40
2.9.2.	Darstellung von Fettsäuremethylestern aus Lipidextrakten	40
2.9.3.	Quantitative Gaschromatographie der Fettsäuremethylester	41
2.10.	Analytische Polyacrylamidgel-Elektrophoresen	41
2.10.1.	Polyacrylamidgel-Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE)	41
2.10.1.1.	Lösungen	42
2.10.1.2.	Gelmischungen	42
2.10.1.3.	Durchführung	43
2.10.2.	Gelelektrophorese in Polyacrylamid-Konzentrationsgradienten unter nativen Bedingungen (System I)	44
2.10.2.1.	Lösungen	45
2.10.2.2.	Gelmischungen	46
2.10.2.3.	Durchführung	46

		Seite
2.10.3.	Gelelektrophorese in Polyacrylamid-Konzentrationsgradienten unter nativen Bedingungen (System II)	47
2.10.3.1.	Taschengel-Lösungen	48
2.10.3.2.	Lösungen für Elektrophorese und Proteinfärbung	48
2.10.3.3.	Durchführung	48
2.10.4.	Kontinuierliche Polyacrylamidgel-Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (SDS/Harnstoff-PAGE)	49
2.10.4.1.	Lösungen	49
2.10.4.2.	Gelmischungen (für 6 und 6.5%ige Acrylamidgele)	49
2.10.4.3.	Vorbehandlung der zu analysierenden Proteinproben	50
2.10.4.4.	Durchführung der Elektrophorese	50
2.11.	Markierung von Hefe- und C.cohnii-FAS durch radioaktive Substrate und Inhibitoren	51
2.12.	Analytische Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation	51
2.13.	Züchtung der Dinoflagellaten	52
2.13.1.	Züchtung von C.cohnii in MLH-Flüssigkulturen	52
2.13.1.1.	Lösungen	52
2.13.1.2.	Züchtungsbedingungen	54
2.13.2.	Züchtung von C.cohnii auf MLH-Agarplatten	55
2.14.	Zellaufschlußmethoden	55
2.14.1.	Zellaufschluß durch Ultraschallbehandlung	55
2.14.2.	Zellaufschluß durch Zermahlen in der DYNO-MILL	56
2.14.2.1.	Aufschlußpuffer	56
2.14.2.2.	Zellaufschluß	56
2.15.	Zellfraktionierung durch differentielle Zentrifugation	57
2.16.	Herstellen eines 100000xg-Überstands als Ausgangsmaterial für die Isolierung der Fettsäuresynthetasen	58
2.17.	Ammoniumsulfatfällungen	58
2.17.1.	Ammoniumsulfat-Stammlösungen	59
2.17.2.	Proteinfällung	59
2.18.	Säulenchromatographien	59
2.18.1.	Chromatographie an DEAE-Cellulose	60
2.18.1.1.	Säulenpuffer	60
2.18.1.2.	Gelvorbehandlung	60
2.18.1.3.	Chromatographieprozedur	60

		Seite
2.18.2.	Chromatographie an DEAE-Sephadex	61
2.18.3.	Chromatographie an Hydroxylapatit	62
2.18.3.1.	Säulenpuffer	62
2.18.3.2.	Gelvorbehandlung	62
2.18.3.3.	Chromatographieprozedur	62
2.18.4.	Affinitätschromatographie von Proteasen an Casein-Sepharose 4B	63
2.19.	Gelfiltrationen	63
2.19.1.	Gelfiltration mit Sephadex G100	64
2.19.2.	Gelfiltration mit Sepharose 4B	64
2.19.3.	Gelfiltration mit Sepharose 6B und Sepharose CL-6B	64
3.	ERGEBNISSE	66
3.1.	Wachstum von C.cohnii in MLH-Flüssigkulturen	66
3.2.	Analyse des Fettsäuremusters der Gesamtlipidfraktion von C.cohnii	67
3.3.	Lokalisierung des Malonyl-CoA-abhängigen Fettsäurebiosynthesesystems in C.cohnii	70
3.4.	Untersuchungen zur de novo-Biosynthese von Fettsäuren im partikelfreien 100000xg-Überstand von C.cohnii	71
3.4.1.	Proteinabhängigkeit der FAS-Reaktion	71
3.4.2.	Zeitlinearität des radioaktiven Enzymtests	72
3.4.3.	pH-Optimum der FAS-Reaktion	74
3.4.4.	Beeinflussung der FAS-Aktivität durch SH-Schutzsubstanzen	75
3.4.5.	Coenzym (NADPH, NADH) - Spezifität der FAS-Reaktion	76
3.4.6.	Bestimmung der Endprodukte der FAS-Reaktion	77
3.4.7.	Fettsäuremuster der FAS-Reaktionsprodukte	78
3.4.8.	Veränderung des Fettsäuremusters der FAS-Reaktionsprodukte durch Konzentrierung oder Anreinigung des 100000xg-Überstands	81
3.5.	Reinigung der Fettsäuresynthetase aus S.cerevisiae	84
3.5.1.	Herstellung eines 100000xg-Überstands als Ausgangsbasis für die FAS-Isolierung	84
3.5.2.	Ammoniumsulfatfraktionierung des 100000xg-Überstands	84
3.5.3.	Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose	85
3.5.4.	Gelfiltration über Sepharose 6B und Sepharose CL-6B	89

		Seite
3.5.5.	Zusammenfassung der Isolierungsprozedur für die Fettsäuresynthetase aus S.cerevisiae	91
3.5.6.	Bestimmung des apparenten Molekulargewichts der Hefe-FAS durch Polyacrylamidgradientengel-Elektrophorese unter nativen Bedingungen	94
3.5.7.	Bestimmung des apparenten Molekulargewichts der Hefe-FAS-Untereinheiten durch Polyacrylamidgel-Elektrophoresen unter denaturierenden Bedingungen	95
3.6.	Reinigung der Fettsäuresynthetase aus C.cohnii	96
3.6.1.	Herstellung eines 100000xg-Überstands als Ausgangsmaterial für die FAS-Isolierung	96
3.6.2.	Ammoniumsulfatfraktionierung des 100000xg-Überstands	97
3.6.3.	Versuche zur Hemmung bzw. Abtrennung von Proteolytischer Aktivität aus C.cohnii-FAS-Präparationen	99
3.6.3.1.	Einfluß der Ammoniumsulfatfällung auf die Aktivität endogen vorhandener Proteasen	99
3.6.3.2.	Unterdrückung der proteolytischen Aktivität durch Zusatz von Proteasehemmstoffen	102
3.6.3.3.	Abtrennung von Proteasen durch Affinitätschromatographie an Casein-Sepharose 4B	104
3.6.4.	Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose	106
3.6.5.	Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex	111
3.6.6.	Chromatographie an Hydroxylapatit (BIO·Gel HTP)	115
3.6.7.	Gelfiltration über Sepharose-Säulen	118
3.6.8.	Zusammenfassung der Isolierungsprozedur für die Fettsäuresynthetase aus C.cohnii	125
3.7.	Eigenschaften der gereinigten Fettsäuresynthetase aus C.cohnii	130
3.7.1.	Proteinabhängigkeit der FAS-Reaktion	130
3.7.2.	pH-Optimum der FAS-Reaktion	131
3.7.3.	Coenzym (NADPH, NADH) - Spezifität der FAS-Reaktion	132
3.7.4.	Substrat (Malonyl-, Acetyl-CoA) - Spezifität der FAS-Reaktion	134
3.7.5.	Fettsäuremuster der FAS-Reaktionsprodukte	138
3.8.	Versuche zur Steigerung der Enzymaktivität der gereinigten Fettsäuresynthetase aus C.cohnii	140
3.8.1.	Aktivierung der C.cohnii-FAS durch Vorinkubation des Enzyms bei Raumtemperatur	140
3.8.2.	Einfluß von DTE auf die FAS-Aktivität	140
3.8.3.	Einfluß der Ionenstärke des Puffers auf die FAS-Aktivität	141
3.8.4.	Beeinflußung der FAS-Aktivität durch Kalium- und Natriumchlorid	143
3.8.5.	Beeinflußung der FAS-Aktivität durch FMN	145

		Seite
3.8.6.	Einfluß von freiem CoASH auf die Aktivität der C.cohnii-FAS	146
3.8.7.	Beeinflußung der C.cohnii-FAS-Aktivität durch andere exogen zugesetzte chemische Faktoren und physikalische Parameter	147
3.9.	Molekulargewichtsbestimmung der Fettsäuresynthetase aus C.cohnii und ihrer Untereinheiten	148
3.9.1.	Versuche zur Bestimmung der molekularen Größe mittels Ultrafiltration über AMICON-Membranen	148
3.9.2.	Gelfiltrationen gereinigter C.cohnii-FAS	149
3.9.3.	Ultrazentrifugation nativer C.cohnii-FAS im Saccharose-Dichtegradienten	150
3.9.4.	Molekulargewichtsbestimmung der C.cohnii-FAS durch Polyacrylamidgradientengel-Elektrophorese unter nativen Bedingungen	152
3.9.5.	Bestimmung der Proteinbande(n) mit FAS-Aktivität nach Polyacrylamidgradientengel-Elektrophorese von C.cohnii-Enzymsuspensionen unter nativen Bedingungen	153
3.9.6.	Bestimmung des apparenten Molekulargewichts der C.cohnii-FAS-Untereinheiten durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (SDS/Harnstoff-PAGE)	157
3.9.7.	Versuche zur Identifizierung der C.cohnii-FAS-Untereinheiten in SDS-Polyacrylamidgelen anhand gebundenen radioaktiven Substrats bzw. Inhibitors	158
3.10.	Bestimmung enzymatischer Teilaktivitäten der gereinigten C.cohnii-FAS	158
3.10.1.	Thioesterase-Teilaktivität	160
3.10.2.	ß-Ketoacyl-Reduktase-Teilaktivität	160
4.	DISKUSSION	161
4.1.	Züchtung der Dinoflagellaten und Analyse des Fettsäuremusters der C.cohnii-Gesamtlipide	161
4.2.	Subzelluläre Lokalisierung des de novo-Biosynthesesystems der Fettsäuren in C.cohnii	162
4.3.	Charakterisierung der de novo-Biosynthese der Fettsäuren in C.cohnii: Vergleich der enzymatischen Eigenschaften des 100000xg-Überstands und der gereinigten FAS	164
4.4.	Reinigung der Fettsäuresynthetase aus S.cerevisiae	177
4.5.	Reinigung der Fettsäuresynthetase aus C.cohnii	180

		Seite
4.6.	Bestimmung des Molekulargewichts der nativen *C.cohnii*-FAS und ihrer Untereinheiten und Klassifizierung des Enzyms als Typ-I-Synthetase	189
5.	ZUSAMMENFASSUNG	197
6.	LITERATURVERZEICHNIS	199

LISTE DER IM TEXT VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

A	= Absorption
abs.	= absolut
Bisacrylamid	= N,N-Methylenbisacrylamid
BPB	= Bromphenolblau
cpm	= counts per minute
DEGS	= Diäthylen-glycol-succinat
DTE	= Dithiothreitol
DTNB	= Ellman's Reagenz; 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoesäure)
E	= Extinktion
ϵ	= Molarer Extinktionskoeffizient
EDTA	= Äthylendiamintetraessigsäure
FAS	= Fatty acid synthetase, Fettsäuresynthetase
FMN	= Flavin-Mononukleotid, Riboflavin-5'-Phosphat
g	= Erdbeschleunigung (9,81 m/sec^2)
h	= Stunden
K-PO_4-(Puffer)	= Kaliumphosphat-(Puffer), K_2HPO_4+KH_2PO_4
KH	= Kilohertz
MES	= 2(N-Morpholino)-Äthansulfonsäure
min	= Minuten
P_i	= anorganisches Phosphat
PMSF	= Phenylmethansulfonylfluorid
POPOP	= 1,4-bis-2-(4-Methyl-5-phenyloxazolyl)-Benzol
PPO	= 2,5-Diphenyloxazol
SDS	= Natriumdodecylsulfat
sec	= Sekunden
TCA	= Trichloressigsäure
TEMED	= N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	= Tris-hydroxymethyl-aminomethan
UpM	= Umdrehungen pro min

1. EINLEITUNG

1.1. ALLGEMEINE ASPEKTE DER BIOSYNTHESE GESÄTTIGTER UND UNGESÄTTIGTER FETTSÄUREN

Die ubiquitär verbreitete und für alle lebenden Systeme essentielle Stoffklasse der Lipide erfüllt in den Zellen und Geweben der Organismen vier generelle Funktionen: a) als Strukturkomponente von Membranen, b) als intrazellulärer Energiespeicher, c) als Transportform metabolischen Brennstoffs und d) als Schutzsubstanz des Organismus gegenüber seiner Umwelt (z.B. bei den Zellwänden der Bakterien, den Blättern höherer Pflanzen, dem Exoskelett der Insekten und der Haut der Vertebraten).

Gesättigte und ungesättigte Fettsäuren stellen die Grundbausteine mehrerer Lipidklassen dar (Neutralfette, Phosphoglyceride, Glycolipide, Sphingolipide und Wachse) und sind Bestandteile oder Vorstufen hormonell agierender Substanzen (z.B. Prostaglandine und Cholesterinester). Der Weg ihrer Biosynthese läßt sich schematisch in drei Reaktionsfolgen gliedern (MAZLIAK, 1973; KUNAU, 1976; SCHWEIZER et al., 1978), die jedoch miteinander verknüpft sind und sich wechselseitig beeinflussen:

1. die de novo-Biosynthese, die die durch koordinierte Aktion von Acetyl-CoA-Carboxylase und Fettsäuresynthetase katalysierte Umwandlung von Acetyl-CoA in geradzahlige, gesättigte Fettsäuren umfaßt;
2. die zumeist Malonyl-CoA-abhängige Elongation der durch die de novo-Biosynthese angelieferten Fettsäuren zu solchen mit längerer Kohlenwasserstoffkette;
3. die außer bei den obligaten und fakultativen Anaerobiern Sauerstoff-bedürftige Desaturierung der durch die 1. bzw. 2. Reaktionsfolge bereitgestellten gesättigten Fettsäuren zu den organismus- und gewebespezifischen Mono- oder Polyensäuren.

Verantwortlich für die Neusynthese der Fettsäuren (1) ist in der Regel ein lösliches Enzymsystem des Cytoplasmas (KIRSCHNER, 1963; VAGELOS, 1971; KATIYAR & PORTER, 1977). Die für die Kettenverlängerung (2) und die Einführung von Doppelbindungen (3) zuständigen Enzyme sind im allgemeinen membrangebunden (NUGTEREN, 1965; STOFFEL, 1966; MAZLIAK, 1973; KUNAU, 1976). Die o.a. Auflistung von Elongation und Desaturierung stellt dabei keine strenge Aufeinanderfolge der beiden Reaktionsketten dar, da sie sich bei der Biosynthese hochungesättigter Fettsäuren normalerweise in alternierendem Rhythmus abwechseln, wodurch aus einer gesättigten eine Vielzahl von ungesättigten Säuren entstehen kann, die sich sowohl hinsichtlich ihrer Kettenlänge als auch in Anzahl und Position der Doppelbindungen voneinander unterscheiden (KUNAU, 1976; QUINN & WILLIAMS, 1978; JEFFCOAT, 1979).

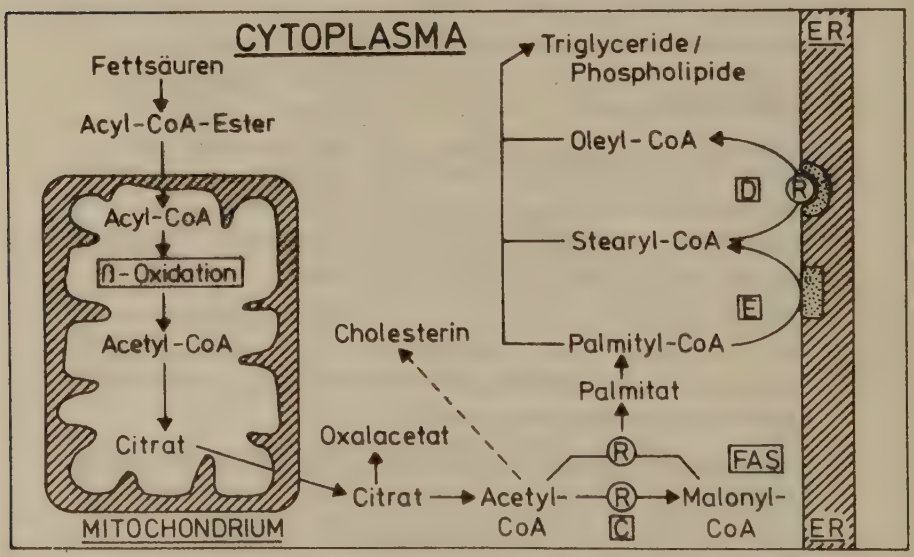


Abb. 1-1: Verknüpfung von Abbau und Neusynthese gesättigter und ungesättigter Fettsäuren am Beispiel der Leberzelle.

C = Acetyl-CoA-Carboxylase; FAS = Fettsäuresynthetase;
E = Elongationssystem; D = Desaturase-Komplex;
ER= Endoplasmatisches Reticulum.
—Ⓡ→ = Regulationsstellen bei der im Beispiel gezeigten Umwandlung von Acetyl-CoA in Oleyl-CoA.

1.2. DE NOVO-BIOSYNTHESE GESÄTTIGTER FETTSÄUREN

Nach der Aufklärung des mitochondrialen Fettsäureabbaues durch den ß-Oxidationszyklus (LYNEN et al., 1952; LYNEN, 1952/53; LYNEN & OCHOA, 1953; LYNEN, 1955) nahm man, ausgehend von den dabei gewonnenen Erkenntnissen, lange Zeit an, daß das zweite Teilgebiet des Fettsäure-Intermediärstoffwechsels - ihre Biosynthese - durch eine Umkehrung dieser Abbausequenz bewerkstelligt würde (LYNEN, 1952/53; LYNEN & OCHOA, 1953; SEUBERT et al., 1957).

Die Befunde von BRADY & GURIN (1952), DITURI & GURIN (1953) sowie von POPJÁK & TIETZ (1954, 1955) deuteten jedoch schon früh darauf hin, daß der primäre Biosyntheseort der Fettsäuren nicht in den Mitochondrien, sondern im Cytoplasma der Zelle zu suchen war. Der entscheidende Durchbruch zur Aufklärung des Mechanismus der cytoplasmatischen de novo-Biosynthese gelang WAKIL und Mitarbeitern gegen Ende der 50er Jahre, die die ATP- und CO_2-Bedürftigkeit der Reaktion nachwiesen (WAKIL et al., 1957; PORTER et al., 1957; GIBSON et al., 1958a, 1958b). Weitere Untersuchungen führten zu der Erkenntnis, daß die Biotin-abhängige Carboxylierung des Acetyl- zum Malonyl-CoA der eigentlichen Fettsäurebiosynthese vorausgehen muß (WAKIL, 1958; WAKIL et al., 1958; FORMICA & BRADY, 1959; LYNEN, 1959). Diese Reaktion wird durch Mg^{2+} oder Mn^{2+} sowie durch Citrat bzw. Isocitrat stimuliert (PORTER et al., 1957; MARTIN & VAGELOS, 1962; WAITE & WAKIL, 1962 und 1963; VAGELOS et al., 1963; LYNEN et al., 1963) und läßt sich in zwei Teilschritte zerlegen (ZAKIM & HERMAN, 1969; VAGELOS, 1971):

$$\text{ATP} + HCO_3^- + \text{Biotin-Enzym} \underset{}{\overset{Mg^{2+}/Mn^{2+}}{\rightleftharpoons}} \text{Carboxybiotin-Enzym} + \text{ADP} + P_i \qquad (1)$$

$$\text{Carboxybiotin-Enzym} + CH_3CO\text{-S-CoA} \rightleftharpoons COOHCH_2CO\text{-S-CoA} + \text{Biotin-Enzym} \qquad (2)$$

Die Wichtigkeit dieser Reaktion für die de novo-Biosynthese wurde von BRADY (1958), WAKIL & GANGULY (1959), LYNEN (1961) sowie EGGERER & LYNEN (1962) aufgezeigt, die die Umwandlung von Malonyl-CoA in langkettige Fettsäuren

durch die nachgeschaltete Reaktionsfolge der Fettsäuresynthetase bewiesen. Diese zweite Reaktionssequenz verläuft nach der von BRESSLER & WAKIL (1961) aufgestellten Bruttogleichung:

$$\text{Acetyl-CoA} + 7\ \text{Malonyl-CoA} + 14(\text{NADPH} + \text{H}^+) \longrightarrow \text{Palmitinsäure} + 8\ \text{CoASH} + 14\ \text{NADP}^+ + 7\ \text{CO}_2 + 6\ \text{H}_2\text{O}. \quad (3)$$

Dabei erfolgt der Einbau der Acetylgruppe stets am Methylende der neugebildeten Fettsäure (LYNEN, 1961; KIRSCHNER, 1963; LYNEN et al., 1964):

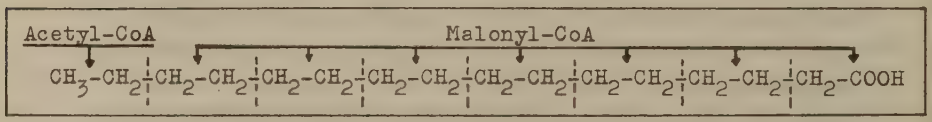


Abb. 1-2: Herkunft der Kohlenstoffatome bei der Biosynthese der Palmitinsäure (nach KIRSCHNER, 1963).

Die als Beispiel angeführte Bildung der Palmitinsäure aus Acetyl- und Malonyl-CoA erfordert mehrere miteinander gekoppelte Reaktionsschritte, wobei die entstehenden Acyl-Intermediate nicht wie bei der ß-Oxidation als freie CoA-Derivate vorliegen, sondern an das Acyl-Carrier-Protein (ACP) der Fettsäuresynthetase gebunden bleiben (VOLPE & VAGELOS, 1976; STOOPS et al., 1977), das als prosthetische Gruppe 4'-Phosphopantethein (MAJERUS et al., 1965) enthält. Die Aufklärung der Reaktionssequenz und die Identifizierung der dabei auftretenden Zwischenprodukte erfolgte hauptsächlich mit Enzymextrakten aus E.coli (WAKIL, 1970; PRESCOTT & VAGELOS, 1972), da die Fettsäuresynthetase dieses Organismus aus individuellen Komponenten besteht und nicht wie bei den eukaryontischen Systemen als intakt isolierbarer, hochmolekularer Enzymkomplex vorliegt. Danach entsteht die Palmitinsäure, das vorherrschende Reaktionsprodukt der meisten Fettsäuresynthetasen (STOOPS et al., 1977), durch die nachfolgend beschriebenen Reaktionen und Enzyme (LYNEN, 1970 und 1972; VAGELOS, 1971; KATIYAR & PORTER, 1977):

Acetyl-Transfer (Acetyl-CoA:ACP-Transacylase):

$$CH_3CO\text{-}S\text{-}CoA + HS\text{-}ACP \rightleftharpoons CH_3CO\text{-}S\text{-}ACP + CoASH \qquad (4)$$

Malonyl-Transfer (Malonyl-CoA:ACP-Transacylase):

$$\begin{matrix} COOH \\ | \\ CH_2CO\text{-}S\text{-}CoA \end{matrix} + HS\text{-}ACP \rightleftharpoons \begin{matrix} COOH \\ | \\ CH_2CO\text{-}S\text{-}ACP \end{matrix} + CoASH \qquad (5)$$

Kondensation (ß-Ketoacyl-ACP-Synthetase):

$$CH_3CO\text{-}S\text{-}ACP + HS\text{-}Enzym \rightleftharpoons CH_3CO\text{-}S\text{-}Enzym + ACP\text{-}SH \qquad (6a)$$

$$CH_3CO\text{-}S\text{-}Enzym + \begin{matrix} COOH \\ | \\ CH_2CO\text{-}S\text{-}ACP \end{matrix} \longrightarrow CH_3COCH_2CO\text{-}S\text{-}ACP + CO_2 + HS\text{-}Enzym \qquad (6b)$$

1. Reduktion (ß-Ketoacyl-ACP-Reduktase):

$$CH_3COCH_2CO\text{-}S\text{-}ACP + NADPH + H^+ \rightleftharpoons CH_3CHOHCH_2CO\text{-}S\text{-}ACP + NADP^+ \qquad (7)$$

Dehydratisierung (ß-Hydroxylacyl-ACP-Dehydrase):

$$CH_3CHOHCH_2CO\text{-}S\text{-}ACP \rightleftharpoons CH_3CH{=}CHCO\text{-}S\text{-}ACP + H_2O \qquad (8)$$

2. Reduktion (2-Enoyl-ACP-Reduktase):

$$CH_3CH{=}CHCO\text{-}S\text{-}ACP + NADPH + H^+ \rightleftharpoons CH_3CH_2CH_2CO\text{-}S\text{-}ACP + NADP^+ \qquad (9)$$

Die Reaktionssequenz wird initiiert durch die Übertragung des Acetyl- und des Malonyl-Rests auf das Acyl-Carrier-Protein (4,5). Dieser Transfer wird durch eine zwischenzeitliche Bindung des betreffenden Acyl-Rests an ein aktives Serin der beteiligten Transacylasen vermittelt. Anschließend erfolgt die Kopplung mit ACP, so daß Acetyl- bzw. Malonyl-ACP entsteht. Die nachfolgende Kondensation läßt sich in zwei Teilschritte gliedern: a) die Bildung von Acetyl-Enzym (6a) und b) die Übertragung der Acetylgruppe auf das C-2-Atom des ans ACP gebundenen Malonylrests (6b), wobei unter Freisetzung von CO_2 Acetoacetyl-ACP gebildet wird. Durch die mit der Kondensation einhergehende Decarboxylierung der Malonylgruppe wird das

Gleichgewicht der Reaktionsfolge in Richtung Synthese verschoben (LYNEN, 1961). Durch Reduzierung des ß-Ketoacyl-ACP mit NADPH entsteht das ß-Hydroxyacyl-ACP (7), das durch die anschließende Dehydratisierung (8) in das a,ß-ungesättigte Acyl-ACP überführt wird. Hieraus entsteht durch eine weitere, zumeist NADPH-abhängige Reduktion (9) das Butyryl-ACP. Dieses Produkt des ersten Synthesezyklus wird nun durch sechsmalige Wiederholung der Reaktionen (6) - (9) um jeweils eine C_2-Einheit verlängert, so daß Palmityl-ACP gebildet wird, welches in E.coli und im tierischen System durch eine spezifische Thioesterase freigesetzt wird (10):

$$CH_3(CH_2)_{14}CO\text{-}S\text{-}ACP + H_2O \rightleftharpoons CH_3(CH_2)_{14}COOH + HS\text{-}ACP \quad (10).$$

Im Gegensatz dazu erfolgt bei der Hefe S.cerevisiae die Produktfreisetzung durch Übertragung der Palmitinsäure auf CoASH (LYNEN, 1969).

Nach ihrem physikochemischen Verhalten in vitro lassen sich die Fettsäuresynthetasen der verschiedenen Organismen in zwei Großkategorien einteilen (BRINDLEY et al., 1969; LYNEN, 1970):

- Typ-I-Synthetasen sind stabile Enzymkomplexe mit Molekulargewichten von 4×10^5 bis 2.3×10^6 Dalton. Durch Behandlung mit SDS und/oder Harnstoff werden sie in zwei Untereinheiten aufgespalten, wobei jeweils mehrere der enzymatischen Teilaktivitäten auf einer Polypeptidkette lokalisiert sind. Diese als "multifunktionell" bezeichneten Untereinheiten (SCHWEIZER et al., 1973; STOOPS et al., 1975) besitzen Molekulargewichte zwischen 1.8 und 2.5×10^5 Dalton (BLOCH & VANCE, 1977) und lassen sich mit herkömmlichen Proteinfraktionierungsmethoden nicht weiter zerlegen (STOOPS et al., 1977).
- Typ-II-Synthetasen bestehen aus individuellen Enzymkomponenten, die im zellfreien System keinerlei physikalische Interaktion zeigen und nur in dem Sinne als Synthetasen anzusprechen sind, als sie in koordinierter Art und Weise einen aus mehreren Schritten bestehenden

Biosyntheseweg katalysieren (LYNEN, 1970). Die Möglichkeit, daß die Einzelenzyme in der intakten Zelle durch nicht-kovalente Kräfte in Form von Multienzymkomplexen zusammengehalten werden, kann allerdings nicht ausgeschlossen werden (KUMAR et al., 1972).

Die Typ-I-Synthetasen lassen sich ihrem Erscheinungsbild nach in zwei Subklassen unterteilen (STOOPS et al., 1977): die Klasse IA beinhaltet Enzymkomplexe mit einem Molekulargewicht von 4-5 x 10^5 Dalton, die sich nach der Formel 1A + 1B aus 2 Untereinheiten zusammensetzen (BLOCH & VANCE, 1977; KATIYAR & PORTER, 1977); die Klasse IB repräsentiert Systeme, die aus Aggregaten zweier unterschiedlicher Polypeptide bestehen. Der am eingehendsten studierte Vertreter dieser Gruppe ist die Fettsäuresynthetase aus S.cerevisiae, die im nativen Zustand einen Komplex aus 6 A- und 6 B-Ketten darstellt (SCHWEIZER, 1977; SCHWEIZER et al., 1978).

Ein weiterer grundlegender Unterschied zwischen den Typ-I- und den Typ-II-Synthetasen besteht in der absoluten Bedürftigkeit der letztgenannten Systeme für das niedermolekulare Acyl-Carrier-Protein (KUMAR et al., 1972; BLOCH, 1977), das bereits aus einigen Bakterien, Algen und höheren Pflanzen isoliert werden konnte (MAJERUS et al., 1964; ALIHAUD et al., 1967; SIMONI et al., 1967; VANAMAN et al., 1968a,b; MATSUMARA, 1970; MATSUMARA et al., 1970; DINELLO & ERNST-FONBERG, 1973; SABAITIS & POWELL, 1976; ERNST-FONBERG et al., 1977; OHLROGGE et al., 1979). Das ACP übt selbst keine enzymatische Funktion aus, ist aber für die während des Biosynthesezyklus auftretenden Acyl-Intermediate als Trägermolekül unerläßlich (VOLPE & VAGELOS, 1976). Im Gegensatz zu den Systemen der Klasse II stellt das ACP bzw. die das 4'-Phosphopantethein enthaltende Peptiddomäne bei den Typ-I-Synthetasen einen integralen Bestandteil einer oder beider multifunktionellen Untereinheiten dar (BLOCH & VANCE, 1977; KATIYAR & PORTER, 1977; STOOPS et al., 1977; SCHWEIZER et al., 1978) und ist nur durch proteolytische Einwirkung aus dem komplexen Enzymverband zu entfernen (VOLPE & VAGELOS, 1976; STOOPS et al., 1977). Die von Lynen und Mitarbeitern beschriebene Iso-

Tab. 1-1: A) Klassifizierung, Molekulargewichte und Hauptreaktionsprodukte bislang untersuchter Fettsäuresynthetase-Komplexe

FAS-Typ[+]	Enzymquelle (Organismus/Gewebe)	Molekulargewicht (Dalton)	Primäres Reaktionsprodukt	Literaturnachweis[++]
IA:	Säugetierleber: Ratte/Schwein/Hund/Kaninchen/Mensch	4-5 x 10^5	Palmitat	1-4/5,6/7/8/9
	Gehirn: Maus	ca. 5 x 10^5	- - -	10
	Brustdrüsen: Ratte/Kaninchen[a]/Kuh/Meerschweinchen Ziege[b]	4-5 x 10^5	Palmitat	11,12/13-16/17-19/20/21
	Fettgewebe: Ratte	ca. 4.6 x 10^5	- - -	4
	Vogelleber: Taube/Huhn	4-5 x 10^5	Palmitat	1,22,23/3,24,25
	Uropygialdrüse: Gans	5.5 x 10^5	Palmitat	26
	Insektenlarven: Ceratitis capitata	5.6 x 10^5	Palmitat	27,28
IB:	Eukaryotische Mikroorganismen:			
	a) Pilze: Saccharomyces/Neurospora/Penicillium	2.3 x 10^6	Palmityl-CoA	29,30/31/32
	Aspergillus	2.26 x 10^6	Stearyl-CoA	33
	Cephalosporium	1.2 x 10^6	Stearat	34
	b) Algen: etiolierte Euglena	1.7 x 10^6	Palmitat	35,36
	Prokaryotische Mikroorganismen:			
	Mycobacterium	1.4-2.0 x 10^6	Tetracosanyl-, Stearyl-CoA	37-40
	Corynebacterium	2.5-3.0 x 10^6	Palmitat	41
	Streptomyces	> 1 x 10^6	Palmitat	42
	Brevibacterium	1.2 x 10^6	Oleyl-CoA	43

[+] FAS-Typ: IA = aus 2 distinkten Untereinheiten bestehende Enzymkomplexe, IB = aus Aggregaten von 2 verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzte Enzymkomplexe;

[++] Literaturnachweis: Aufschlüsselung der Literaturangaben siehe Legende zu Tab. 1-1,B.

a) Das Molekulargewicht des nativen FAS-Komplexes aus Kaninchen-Brustdrüsen wurde auch mit 9.1 bzw. 9.68 x 10^5 angegeben (s. 13-15), wohingegen HARDIE & COHEN (16) 5.15 x 10^5 fanden;

b) Für das Enzym aus Ziegen-Brustdrüse wurde ein $S_{20,w}$-Wert von 12.4 gefunden (21).

Tab. 1-1: B) Klassifizierung und Reaktionsprodukte von bislang untersuchten, dissoziierbaren und ACP-abhängigen FAS-Systemen

FAS-Typ[+]	Enzymquelle (Organismus/Zellfraktion)	Primäre Reaktionsprodukte	Literatur-nachweis[++]
II:	Höhere Pflanzen:		
	a) Chloroplasten:		
	Spinat/Salat/Soja-bohnen-Keimblätter	Palmitat, Oleat, Stearat	44,57,66/45,57/ 59,65
	b) Plastiden, Proplastiden:		
	Avocados/Blumenkohl/ Ricinus-Endosperm/ Sojabohnen-Zellkultur	Palmitat, Oleat, Stearat	46,58,63,64/ 63/62/60
	c) Chromoplasten:		
	Narcissus (Osterglocken)	Palmitat	61
	Algen:		
	Chlamydomonas-/Euglena-Chloroplasten	Stearat/Palmitat	47/35,36, 48-50,56
	Prokaryonten:		
	Escherichia/Clostridium/ Pseudomonas	Palmitat, Oleat, Stearat, cis-Vaccenat	51-53,55/54/ 51
	Bacillus subtilis	verzweigtkettige C_{15}-, C_{17}-Säuren	55

[+] FAS-Typ: II = aus unassoziierten Einzelenzymen bestehende FAS-Systeme, ACP-abhängig, keine Komplexbildung in vitro;

[++] Literaturnachweis: 1 = BURTON et al., 1968; 2 = NEPOKROEFF et al., 1975; 3 = STOOPS et al., 1975; 4 = STOOPS et al., 1979; 5 = KIM et al., 1977; 6 = DUTLER et al., 1971; 7 = RONCARI, 1974a; 8 = DEMASSIEUX & LACHANCE, 1974; 9 = RONCARI, 1974b; 10 = GOLDBERG & BLOCH, 1977; 11,12 = SMITH & ABRAHAM, 1970, 1975; 13 = CAREY & DILS, 1970; 14 = DILS & CAREY, 1975; 15 = PASKIN & MAYER, 1976; 16 = HARDIE & COHEN, 1978; 17 = KNUDSEN, 1972; 18 = MAITRA & KUMAR, 1974; 19 = KINSELLA et al., 1975; 20 = STRONG & DILS, 1972; 21 = NANDEDKAR et al., 1969; 22 = HSU et al., 1969; 23 = MUESING & PORTER, 1975; 24 = HSU & YUN, 1970; 25 = ARSLANIAN & WAKIL, 1975; 26 = BUCKNER & KOLATTUKUDY, 1976; 27 = MUNICIO et al., 1977; 28 = GAVILANES et al., 1979; 29 = LYNEN, 1969; 30 = STOOPS et al., 1978a; 31 = ELOVSON, 1975; 32 = HOLTERMÜLLER et al., 1970; 33 = GIOMPRES & PACKTER, 1978; 34 = KAWAGUCHI et al., 1979; 35 = DELO et al., 1971; 36 = GOLDBERG & BLOCH, 1972; 37 = BRINDLEY et al., 1969; 38 = VANCE et al., 1973; 39 = BLOCH, 1977; 40 = WOOD et al., 1978; 41 = KNOCHE & KOTHS, 1973; 42 = ROSSI & CORCORAN, 1973; 43 = KAWAGUCHI & OKUDA, 1977; 44 = SIMONI et al., 1967; 45 = BROOKS & STUMPF, 1966; 46 = OVERATH & STUMPF, 1964; 47 = SIREVÅG & LEVINE, 1972; 48 = ERNST-FONBERG & BLOCH, 1971; 49 = ERNST-FONBERG, 1973; 50 = ERNST-FONBERG et al., 1974; 51 = LENNARZ et al., 1962; 52 = GOLDMAN et al., 1963; 53 = PUGH et al., 1966; 54 = GOLDMAN & VAGELOS, 1962; 55 = BUTTERWORTH & BLOCH, 1970; 56 = HENDREN & BLOCH, 1980; 57 = BROOKS & STUMPF, 1965; 58 = HARWOOD & STUMPF, 1972; 59 = RUTKOSKI & JAWORSKI, 1978; 60 = NOTHELFER et al., 1977; 61 = KLEINIG & LIEDVOGEL, 1978; 62 = VICK & BEEVERS, 1978; 63,64 = WEAIRE & KEKWICK, 1975a,b; 65 = PORRA & STUMPF, 1976; 66 = OHLROGGE et al., 1979.

lierung eines ACP aus gereinigter S.cerevisiae-FAS (WILLECKE et al., 1969) und die von anderen Arbeitsgruppen aus tierischen Synthetasen gewonnenen, 4'-Phosphopantethein-haltigen niedermolekularen Peptide (LORNITZO et al., 1974; RONCARI, 1974a; BRATCHER & HSU, 1975; QURESHI et al., 1976b) dürften daher weniger auf ein durch nicht-kovalente Kräfte an den Komplex gebundenes ACP als vielmehr auf die einigen Fettsäuresynthetasen innewohnende eigenproteolytische Aktivität zurückzuführen sein (STOOPS et al., 1977). SCHWEIZER et al. (1973) sowie WAKIL und Mitarbeiter (STOOPS et al., 1975, 1978a,b, 1979; STOOPS & WAKIL, 1978) konnten zeigen, daß bei Reinigung von Synthetasekomplexen aus diversen Organismen in Gegenwart des Proteasehemmstoffs PMSF kein ACP mehr aus dem Enzymverband zu lösen und die das 4'-Phosphopantethein enthaltende Peptidregion ein Bestandteil einer der beiden hochmolekularen Untereinheiten ist. Auch die zuvor beobachtete Auftrennung der Typ-I-Enzyme in mehrere Proteinkomponenten durch Behandlung mit SDS und/oder Guanidin·HCl sowie die Bestimmung von mehr als 2 N-terminalen Aminosäuren (LYNEN, 1967; YANG et al., 1967) konnte in Gegenwart von PMSF nicht nachvollzogen werden (STOOPS et al., 1977). Die LYNENsche "Multienzymkomplex-Hypothese", wonach die Typ-I-Synthetasen aus durch starke, nicht-kovalente Kräfte zusammengehaltenen Einzelenzymen bestehen (LYNEN, 1970), wurde als Folge der oben zitierten Arbeiten der Gruppe um WAKIL sowie der extensiven genetischen Untersuchungen von SCHWEIZER und Mitarbeitern an Fettsäure-auxotrophen Hefe-Mutanten (SCHWEIZER & BOLLING, 1970; SCHWEIZER et al., 1971 und 1973; KÜHN et al., 1972; KNOBLING et al., 1975) zum eingangs beschriebenen Konzept der multifunktionellen Polypeptide revidiert. Die Arbeitsgruppe von SCHWEIZER konnte zeigen, daß sämtliche FAS-Teilaktivitäten in der Hefe von nicht mehr als zwei ungekoppelten Gencoli kodiert werden ("fas 1" und "fas 2"), die auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert (SCHWEIZER et al., 1978) und eher als polyfunktionelle Gene (Cistrons) denn als Gen-'Cluster' oder Operons anzusprechen sind (BURKL et al., 1972; TAURO et al., 1974; SCHWEIZER et al., 1978).

Dabei kodieren die beiden Genloci für jeweils eine der beiden mit einem unterschiedlichen Enzymsatz bestückten Polypeptide (A oder B), die zusammengefaßt alle vom nativen Enzymkomplex katalysierten Funktionen ausüben können. Nach den anhand von biochemischer Charakterisierung verschiedener Komplementationsgruppen gewonnenen Erkenntnissen kodieren die beiden Cistrons für die nachfolgend aufgelisteten Einzelfunktionen der zwei multifunktionellen Untereinheiten (SCHWEIZER, 1977):

fas 1	fas 2
Untereinheit B:	Untereinheit A:
Acetyl-Transacylase, Malonyl/Palmityl-Transacylase, Dehydratase, Enoyl-Reduktase;	4'Phosphopantethein-Region, ß-Ketoacyl-Synthetase, ß-Ketoacyl-Reduktase.

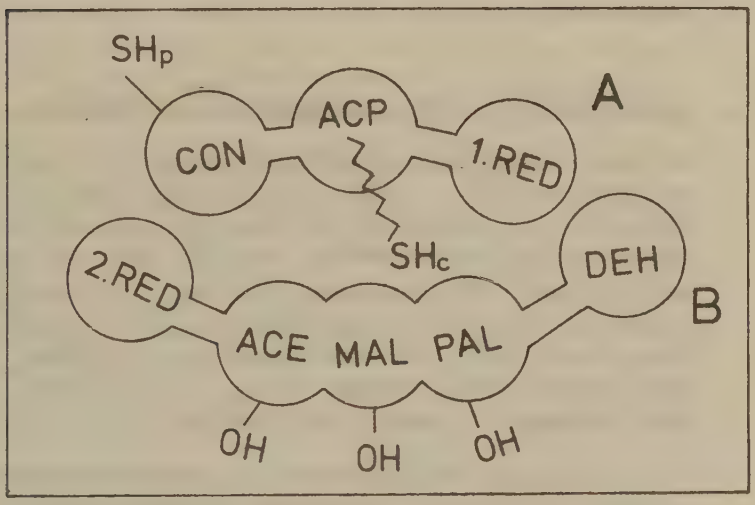


Abb. 1-3: Modell aus 2 unterschiedlichen multifunktionellen Polypeptiden (A,B) bestehender Typ-IB-Synthetasen am Beispiel der Hefe-FAS (nach SCHWEIZER, 1977; SCHWEIZER et al., 1978).

A-Kette: CON= 'condensing enzyme' (ß-Ketoacyl-Synthetase), ACP= Acyl-Carrier-Protein, 1.RED= ß-Ketoacyl-Reduktase;

B-Kette: DEH= Dehydratase, PAL= Palmityl-Transferase, 2.RED= Enoyl-Reduktase; $-SH_p$= periphere, $-SH_c$= zentrale SH-Gruppe.

Ob die beiden vom Molekulargewicht her generell größeren Untereinheiten der tierischen Synthetasekomplexe verschiedene katalytische Funktionen tragen, wie es bei der Hefe-FAS der Fall ist (s. Abb. 1-3), oder ob es sich dabei um identische Polypeptide mit jeweils einem kompletten Satz aller Teilaktivitäten handelt, konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden. Es liegen Ergebnisse vor, die sowohl für die erste (YUN & HSU, 1972; LORNITZO et al., 1975; QURESHI et al., 1976a; KATIYAR & PORTER, 1977) als auch für die letztgenannte Möglichkeit sprechen (BUCKNER & KOLATTUKUDY, 1976; DILEEPAN et al., 1978; GUY et al., 1978; CLEMENTS et al., 1979; SMITH & STERN, 1979; STOOPS et al., 1979; POULOSE & KOLATTUKUDY, 1980a,b). Die Fülle von jüngst veröffentlichten Daten scheint jedoch eher auf eine "Homodimer"- denn auf eine "Heterodimer"-Struktur (STOOPS et al., 1978b, 1979) tierischer FAS-Komplexe hinzudeuten.

1.3. KETTENVERLÄNGERUNG UND DESATURIERUNG DER FETTSÄUREN

Die durch die de novo-Biosynthese bereitgestellten gesättigten Fettsäuren dienen in allen Organismen als Vorstufen für die Bildung der zelleigenen Mono- oder Polyensäuren (KUNAU, 1976; JEFFCOAT, 1977 und 1979). Für diesen weiterführenden Stoffwechselweg sind zwei Enzymsysteme notwendig, die in der eukaryontischen Zelle am endoplasmatischen Reticulum lokalisiert sind (NUGTEREN, 1965; STOFFEL, 1966; GUCHHAIT et al., 1966; HOWARD, 1968; AEBERHARD & MENKES, 1968; KOEPPEN et al., 1973):

1. die Elongasen, die gesättigte wie ungesättigte Fettsäuren um weitere C_2-Einheiten verlängern, und
2. die Desaturasen, die bei breiter Kettenlängenspezifität in einer O_2-abhängigen Reaktion cis-Doppelbindungen an bestimmten Positionen in die durch Neusynthese oder Elongation angelieferten Fettsäuren einführen.

Elongation

Der Ablauf der mikrosomalen Kettenverlängerung erfolgt dabei analog zur bereits bei der de novo-Biosynthese der Fettsäuren besprochenen Reaktionssequenz (KUNAU, 1976). Während die auftretenden Intermediate bei der Neusynthese der Fettsäuren jedoch enzymgebunden vorliegen, existieren sie hier als freie CoA-Ester, so daß die einzelnen Reaktionsschritte und Zwischenprodukte des Kettenverlängerungsprozesses eingehend studiert werden konnten (BERNERT & SPRECHER, 1977). Abgesehen von der Erkenntnis, daß die Elongasen membranständige Enzymsysteme darstellen, liegen zur proteinchemischen Struktur der Einzelkomponenten und zu ihrer Organisation am endoplasmatischen Reticulum nur wenige Daten vor (BLOCH & VANCE, 1977). Ob sie in der lebenden Zelle in Form eines membran-assoziierten oder -integrierten Multienzymkomplexes vorliegen, wie von SEUBERT und Mitarbeitern vorgeschlagen wurde (PODACK et al., 1974a,b), bedarf noch weiterer Untersuchungen. Ein erster Schritt zur Isolierung und Charakterisierung der am Elongationszyklus beteiligten Enzyme gelang BERNERT & SPRECHER (1979), die die Solubilisierung und teilweise Reinigung der ß-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrase aus Rattenleber publizierten. Eine mögliche Beteiligung des auch für andere Stoffwechselwege (s. Desaturierung) wichtigen mikrosomalen Cytochrom b_5 an der Elongation der Fettsäuren wurde kürzlich von KEYES et al. (1979) angedeutet. Weitgehend ungeklärt ist auch die Frage, wieviel Elongationssysteme unterschiedlicher Kettenlängenspezifität in den diversen Organismen und Geweben vorhanden sind. Lediglich für aus Mäusegehirn gewonnene ER-Partikel konnte bislang die Existenz von drei distinkten Elongasen eindeutig nachgewiesen werden, welche bevorzugt C_{16}-, C_{18}- oder C_{20}-CoA-Ester umsetzen (POLLET et al., 1969; BOURRE et al., 1971 und 1973; GOLDBERG et al., 1973). Dabei blieb offen, ob es sich hier um drei gänzlich verschiedene Enzymsysteme handelt oder ob ihnen einzelne Komponenten gemeinsam sind und sie sich nur in Bezug auf die eine oder andere Teilaktivität (z.B. Transacylase und/oder 'condensing enzyme') voneinander unterscheiden (BLOCH & VANCE, 1977).

Desaturierung

Die Desaturase-Komplexe des endoplasmatischen Reticulums sind demgegenüber bereits im wesentlichen charakterisiert (JEFFCOAT, 1977 und 1979; QUINN & WILLIAMS, 1978). Ihre Einzelkomponenten wurden sowohl aus der Alge Euglena gracilis gewonnen (NAGAI & BLOCH, 1966; BLOCH, 1969), wo sie im Gegensatz zu anderen Desaturase-Systemen nicht membrangebunden vorliegen, wie auch aus tierischer Leber isoliert und charakterisiert (HOLLOWAY, 1971; OSHINO et al., 1971; SPATZ & STRITTMATTER, 1971 und 1973; STRITTMATTER et al., 1974; JEFFCOAT et al., 1977; PALTAUF, 1978; DAILEY & STRITTMATTER, 1978, 1979, 1980; OKAYASU et al., 1979; PRASAD & JOSHI, 1979; PRASAD et al., 1980). Durch Rekonstitutionsexperimente mit solubilisierten und gereinigten Einzelkomponenten konnte ihr Zusammenwirken und der Mechanismus der Desaturase-Reaktion aufgeklärt werden (OKUDA et al., 1972; SHIMAKATA et al., 1972; ROGERS & STRITTMATTER, 1973; ENOCH et al., 1976). Danach bestehen die Desaturase-Komplexe des tierischen Systems aus drei sequentiell agierenden Proteinen (s. Abb. 1-4):

1. den NADH/NADPH-Cytochrom-b_5-Reduktasen, die durch Membranverankerung mittels eines hydrophoben Schwanzes und ihren dem Zellinnenraum zugekehrten, Flavin enthaltenden hydrophilen Hauptanteil besonders geeignet sind, Elektronen von reduzierten Pyridinnukleotiden des Cytoplasmas auf ein weiteres Membranprotein zu übertragen;

2. dem Häm-Eisen-Protein Cytochrom b_5, das Elektronen vom reduzierten Flavinnukleotid (aus 1.) übernimmt und an das Nicht-Häm-Eisen der terminalen Desaturase(n) abgibt;

3. dem eigentlichen O_2-aktivierenden Enzym, der Desaturase, die die Einführung von cis-Doppelbindungen in Acyl-CoA-Ester katalysiert.

Bis dato ungeklärt ist, ob für die Übertragung der 2 Elektronen vom NAD(P)H auf den molekularen Sauerstoff evtl. 2 Cytochrom-b_5-Proteine pro Komplex vorhanden sind

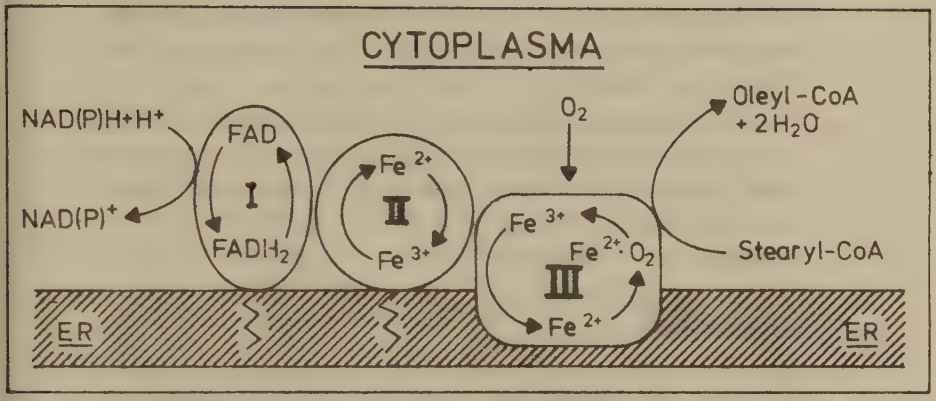


Abb. 1-4: Elektronentransportkette und Desaturierung von Stearyl-CoA am Beispiel des Δ^9-Desaturase-Komplexes aus Rattenleber-Mikrosomen (verändert nach OSHINO et al., 1971; JEFFCOAT et al., 1977; JEFFCOAT, 1979).

ER = Lipiddoppelschicht des endoplasmatischen Reticulums; I = NAD(P)H-Cytochrom-b_5-Reduktase; II = Cytochrom b_5; III= terminale Desaturase.

(das o.a. Schema stellt nur eine 1-Elektronen-Transportkette dar) und auf welche Weise die Entfernung der beiden Wasserstoffe aus der gesättigten Acylkette des Stearyl-CoA erfolgt. Während die NADH/NADPH-Cytochrom-b_5-Reduktasen und das Cytochrom b_5 nur durch einen hydrophoben Peptidschwanz in der Phospholipidschicht des endoplasmatischen Reticulums verankert sind (s. Abb.1-4), nimmt man aus Gründen der starken Hydrophobizität der terminalen Desaturase an, daß diese ein echtes integrales Membranprotein nach der Definition von SINGER & NICOLSON (1972) darstellt, von dem nur ein kleiner, das aktive Zentrum beinhaltender Teil dem Cytoplasma zugewandt ist (ENOCH et al., 1976; JEFFCOAT, 1977; JEFFCOAT et al., 1977). Für die Desaturierung im Säugetiersystem lassen sich nach JEFFCOAT (1979) fünf generelle Regeln aufstellen:

1. die Desaturasen benötigen molekularen Sauerstoff, ein reduziertes Pyridinnukleotid und für die direkte oxidative Desaturierung Fettsäuren in Form ihrer CoA-Ester als Substrate;

2. die cis-Doppelbindungen werden stets in einer bestimmten Entfernung (Position) vom Carboxylende eingeführt; dabei agieren die bisher bekannten Desaturasen spezifisch an den Positionen Δ^9, Δ^6, Δ^5 oder Δ^4 (s.a. BRENNER, 1977; JAMES, 1977);

3. bei gesättigten Fettsäuren wird die erste Doppelbindung stets zwischen C-9 und C-10 eingeführt; bei ungesättigten Säuren entstehen weitere Doppelbindungen zwischen dem Carboxylende und der diesem am nächsten gelegenen Doppelbindung, wobei die Doppelbindungen gewöhnlich durch eine Methylengruppe voneinander getrennt sind ("Polyallylrhythmus"; KUNAU, 1976);

4. bei der Biosynthese der Polyensäuren erfolgen Elongation und Desaturierung in alternierendem Rhythmus;

5. Ungesättigte Säuren mit trans-Konfiguration der Doppelbindung werden normalerweise wie gesättigte Fettsäuren behandelt.

1.4. UNTERSUCHUNGSOBJEKT UND THEMENSTELLUNG

Der Dinoflagellat Crypthecodinium cohnii (s. Abb. 1-5, A und B), früher auch als Gyrodinium cohnii bezeichnet, gehört als heterotropher Einzeller der für die marine Nahrungsmittelkette wichtigen Gruppe des Zooplanktons an. Bislang durchgeführte, fast ausschließlich morphologische und genetische Studien zeigten, daß die Dinoflagellaten typische Merkmale von Pro- und Eukaryonten in sich vereinigen (RIS, 1962; DODGE, 1966; KUBAI & RIS, 1969; SOYER, 1978; BODANSKY et al., 1979) und somit ein frühes Stadium der Eukaryontenevolution widerspiegeln (WERNER-SCHLENZKA et al., 1978; BODANSKY et al., 1979). Aus diesem Grunde wurden die Dinoflagellaten von DODGE (1965) als "mesokaryotisch" klassifiziert. Wie alle Eukaryonten besitzt C.cohnii einen von einer Membran

umgebenen Zellkern sowie Mitochondrien (KUBAI & RIS, 1969; LOEBLICH, 1976). Der DNA-Gehalt pro Zelle entspricht demjenigen des Menschen und die genetische Substanz zeigt die bei höheren Organismen üblichen repetierenden Sequenzen (ALLEN et al., 1975). Die ribosomale RNA zeigt zwar einige Besonderheiten, ist aber trotzdem als typisch eukaryontisch anzusehen (WERNER-SCHLENZKA et al., 1978). In Hinsicht auf Struktur, Organisation und Verdoppelungsmechanismus des genetischen Materials weist C.cohnii mehrere für Eukaryonten untypische Merkmale auf. So liegen die Chromosomen während des gesamten Zellzyklus, einschließlich der Interphase, in kondensierter Form vor (KUBAI & RIS, 1969) und bestehen aus dünnen Chromatinfibern von 40-60 Å Dicke im Gegensatz zu den 100-300 Å starken Fibrillen der übrigen Eukaryonten (HAMKALO & RATTNER, 1977). Das Chromatin ist nicht mit Histonen oder Histonähnlichen Proteinen assoziiert (RIZZO & NOODEN, 1974) und zeigt keine Anordnung in Form von Nukleosomen (BODANSKY et al., 1979). Eine ungewöhnlich hohe und sonst nur von B.subtilis-Phagen her bekannte Substitution der Thymin-Basen durch 5-Hydroxymethyl-Uracil kennzeichnet die C.cohnii-DNA (RAE, 1973) und scheint ein für alle Dinoflagellaten charakteristisches Merkmal zu sein (RAE & STEELE, 1978). Der Mechanismus der mitotischen Zellkernteilung (DODGE, 1966; KUBAI & RIS, 1969; Soyer, 1978) sowie die während der Meiose auftretenden Phänomene (BEAM & HIMES, 1974; HIMES & BEAM, 1975; BEAM et al., 1977) weichen stark von den bei anderen höheren Organismen beobachteten Vorgängen ab.

Im Gegensatz zu den detaillierten genetischen Untersuchungen liegen zur Charakterisierung der in C.cohnii stattfindenden Stoffwechselprozesse nur wenige Erkenntnisse vor. Bis dato publizierte Arbeiten befaßten sich hauptsächlich mit den Wachstumsbedingungen des Organismus (PROVASOLI & GOLD, 1962; KELLER et al., 1968; TUTTLE & LOEBLICH, 1975) sowie mit der beobachteten Dimethylsulfid-Produktion der Zellen (ISHIDA & KADOTA, 1965 und 1967; ISHIDA, 1968; KADOTA & ISHIDA, 1968). In vitro-

Untersuchungen kataboler wie anaboler Stoffwechselwege anhand gereinigter Enzyme wurden bislang nicht veröffentlicht.

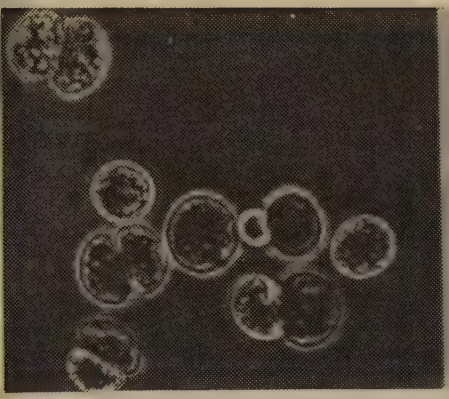
Photoautotrophe und heterotrophe Dinoflagellaten weisen einen extrem hohen Anteil von Polyensäuren an den Gesamt-Fettsäuren der Zelle auf (PATTON et al., 1966, 1967; DUNHAM et al., 1966; SHAW, 1966; HARRINGTON et al., 1970; JOSEPH, 1975) und werden deshalb als primäre Produzenten der besonders in marinen Invertebraten häufig vorkommenden Docosahexaensäure angesehen (HARRINGTON et al., 1970; ACKMAN et al., 1968, 1971). Diese Polyensäure ($C_{22:6,\Delta^{4,7,10,13,16,19}}$, n-3) macht bei C.cohnii rund 30% der zelleigenen Fettsäuren aus (HARRINGTON & HOLZ, 1968) und repräsentiert 66% der in den Membran-Phospholipiden vorhandenen Acyl-Ketten (BEACH & HOLZ, 1973). Die für photoautotrophe Dinoflagellaten typischen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie $C_{18:2}(n-6)$, $C_{18:3}(n-3)$, $C_{18:4}(n-3)$, $C_{18:5}(n-3)$ und $C_{20:5}(n-3)$ (HARRINGTON et al., 1970; JOSEPH, 1975) sind in C.cohnii nicht vorhanden (HARRINGTON & HOLZ, 1968; BEACH et al., 1974). Diese Polyensäuren sind nach dem heutigen Stand der Erkenntnisse stets Zwischenprodukte der durch alternierende Elongations- und Desaturase-Reaktionen erfolgenden Synthese der Docosahexaensäure und kommen normalerweise in gut feststellbaren Mengen in den Phospholipiden und Triglyceriden aller Zellen vor, deren enzymatischer Apparat zur Bildung dieser hochungesättigten Fettsäure befähigt ist (BEACH et al., 1974). Die Biosynthese der (n-3)-Polyensäuren geht in tierischen wie im pflanzlichen Organismus im allgemeinen von Stearinsäure ($C_{18:0}$) aus (KUNAU, 1976; HARWOOD & STUMPF, 1976; QUINN & WILLIAMS, 1978; JEFFCOAT, 1979). In den Chloroplasten höherer Pflanzen wird außerdem $C_{12:0}$ durch 3 hintereinandergeschaltete Desaturierungen zu Dodecatrienoat ($C_{12:3}$) umgewandelt, das durch im Stroma situierte Elongasen zu Linolensäure ($C_{18:3}$) verlängert werden kann (JACOBSON et al., 1973a,b; KANNANGARA et al., 1973; HARWOOD & STUMPF, 1976). Dieser alternative Biosyntheseweg wird auch in Penicillium chrysogenum vermutet (RICHARDS & QUACKENBUSH, 1974). Der Versuch, durch Verfütterung

^{14}C-markierter Vorstufen (BEACH, 1972; BEACH et al., 1974) die Existenz der o.g. mehrfach ungesättigten Fettsäuren als Intermediärprodukte der Docosahexaensäurebiosynthese auch in C.cohnii zu zeigen und auf diese Weise den in diesem Organismus verwirklichten Syntheseweg der $C_{22:6}$-Säure aufzuklären, war nicht erfolgreich. Angebot von mittel- und langkettigen, radioaktiv-markierten Fettsäuren führte nur zur Inkorporierung von ^{14}C in die Ölsäure ($C_{18:1,\Delta^9}$), nicht aber in die Docosahexaensäure. Markierung von $C_{22:6}$ wurde nur bei Verfütterung von radioaktivem Acetat bzw. Octanoat beobachtet, wobei letzteres offensichtlich nicht kettenverlängert wurde, sondern nach erfolgter ß-Oxidation als Quelle für C_2-Einheiten diente (BEACH et al., 1974). So kann prinzipiell nicht ausgeschlossen werden, daß die Biosynthesewege der Ölsäure und der Docosahexaensäure in C.cohnii in getrennten Zellkompartimenten ablaufen oder daß die Fettsäuresynthetase dieses Organismus zur Einführung von Doppelbindungen befähigt ist, wodurch die Abwesenheit bekannter Zwischenprodukte erklärbar würde. Ähnliches wurde für die FAS aus Brevibacterium ammoniagenes beobachtet (KAWAGUCHI & OKUDA, 1977).

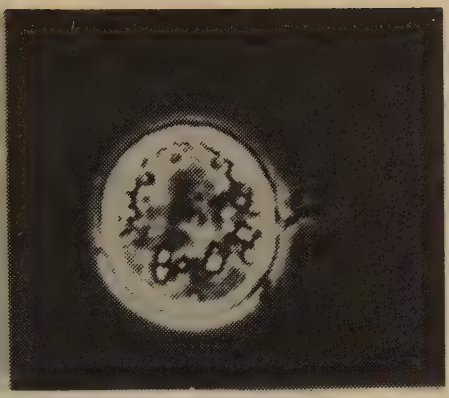
Die vorliegende Arbeit stellt den ersten Versuch dar, die Fettsäurebiosynthese in C.cohnii anhand definierter Zellfraktionen bzw. gereinigter Enzyme zu studieren. Als Grundvoraussetzung für die Aufklärung des in diesem Organismus realisierten Biosynthesewegs der Docosahexaensäure wurde dabei die Neusynthese von Fettsäuren durch die C.cohnii-FAS eingehend untersucht. Neben der subzellulären Lokalisierung des de novo-Biosynthesesystems und der Reinigung und Charakterisierung der Fettsäuresynthetase wurde besonderer Wert auf die Analyse der entstandenen Reaktionsprodukte gelegt. Von besonderer Wichtigkeit war dabei, ob die Dinoflagellaten-FAS zur Bildung ungesättigter Fettsäuren befähigt ist. Als Voraussetzung zum Studium der Fettsäurebiosynthese wurde ein Enzymtest mit (2-^{14}C)-Malonyl-CoA als Substrat entwickelt, anhand dessen die Verfolgung der Enzymaktivität der C.cohnii-FAS während der Isolierungsprozedur sowie die Analyse der

Reaktionsprodukte möglich war. Bei der Charakterisierung der gereinigten Fettsäuresynthetase war von besonderem Interesse, ob das Enzym eher prokaryotische (ACP-Abhängigkeit, Zusammensetzung aus individuellen Komponenten) oder eukaryotische Merkmale (als fester Enzymkomplex isolierbar) aufweist bzw. die als "mesokaryotisch" beschriebenen Eigenschaften seines genetischen Materials widerspiegelt, indem es eine Zwitterstellung (z.B. als lose aggregierter Multienzymkomplex) einnimmt. Als typisch eukaryotisches Vergleichsenzym diente dabei die Fettsäuresynthetase aus S.cerevisiae, für die in der vorliegenden Arbeit eine neue Reinigungsprozedur vorgestellt wird.

I



II



III

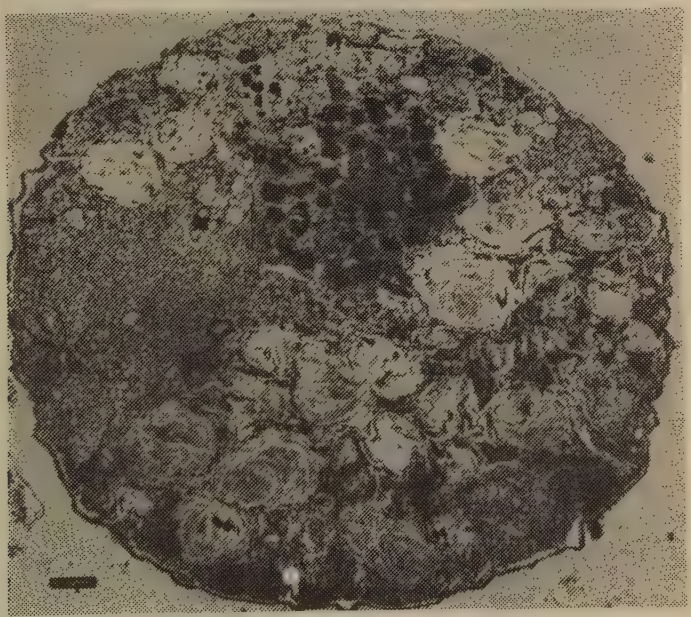


Abb. 1-5,A: Phasenkontrast- und elektronenoptische Aufnahmen von Crypthecodinium cohnii.

I = Phasenkontrastaufnahme von aggregierten, z.T. in Teilung befindlichen Zellen;
II = Phasenkontrastbild einer Einzelzelle mit Geißel;
III = Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Dünnschnitts einer C.cohnii-Zelle aus der stationären Wachstumsphase.

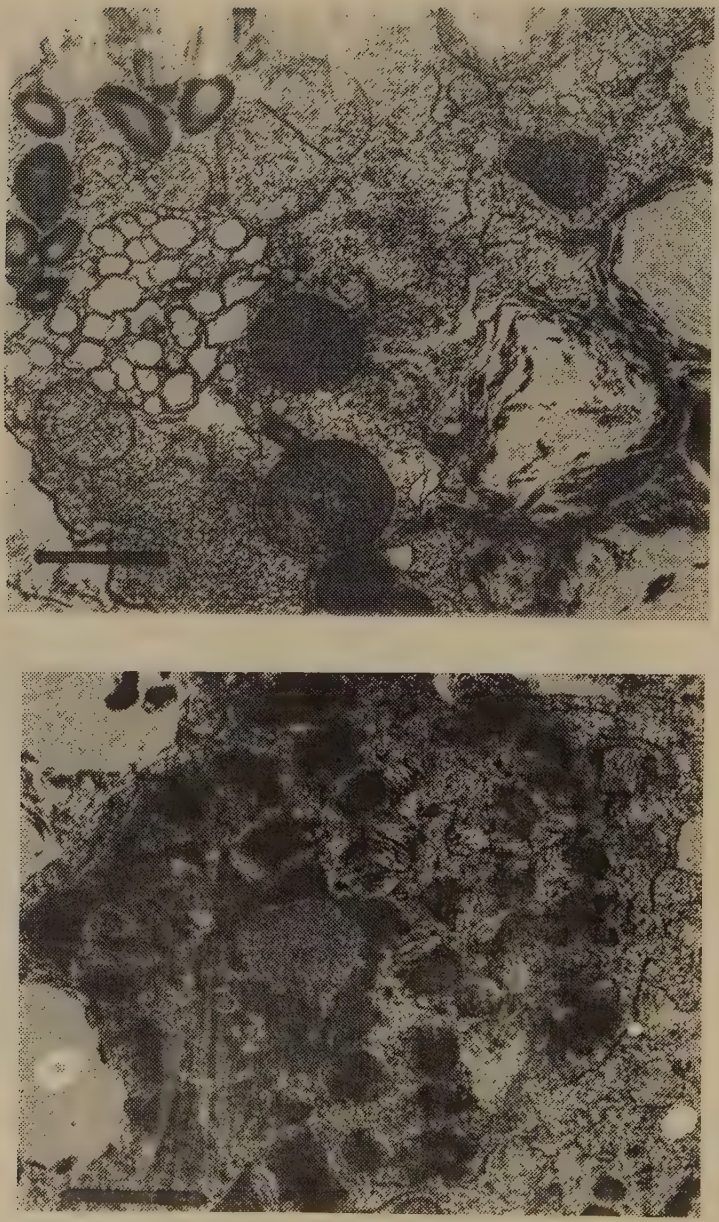


Abb. 1-5,B: Ausschnittvergrößerungen von Abb. 1-5,A; Nr. 111. Der jeweils links unten eingezeichnete Strich repräsentiert 1 µ.

MATERIAL UND METHODEN

1. CHEMIKALIEN UND FEINCHEMIKALIEN

Sämtliche in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien waren von p.A.-Qualität und stammten von den üblichen, in der Bundesrepublik Deutschland vertretenen Herstellerfirmen. Organische Lösungsmittel aus Hochschullieferungen (wie Diäthyläther und Methanol) wurden vor dem Gebrauch durch Überdestillieren gereinigt.

2. MIKROORGANISMEN

Eine Startkultur von C.cohnii, Stamm GC, war ein Geschenk von E. WERNER, Robert-Koch-Institut des Bundesgesundheitsamtes in Berlin.

S.cerevisiae, Stamm X2180-1A, wurde von R. BETZ, Ruhr-Universität Bochum, in Form von 'packed cells' zur Verfügung gestellt.

3. ENZYME UND EICHPROTEINE

Phosphorylase-Kinase (aus Kaninchen-Skelettmuskel) wurde von G. DICKNEITE und K.P. KOHSE, Ruhr-Universität Bochum, zur Verfügung gestellt. DNA-abhängige RNA-Polymerase aus E.coli war ein Geschenk von W. RÜGER, Ruhr-Universität Bochum.
Fettsäuresynthetase aus S.cerevisiae wurde nach einem selbst entwickelten Zwei-Schritt-Verfahren (s. 3.5) isoliert. Die im übrigen benutzten Enzyme und Eichproteine (Catalase, LDH, ß-OH-Acyl-CoA-DH, ß-Galactosidase, Fumarase, Rinderserumalbumin (BSA) und Ferritin) wurden käuflich erworben.

2.4. ALLGEMEINE METHODEN UND VERWENDETE GERÄTE

2.4.1. ZENTRIFUGATIONEN

Niedertourige Zentrifugationen bei Raumtemperatur wurden in einer HERAEUS-CHRIST-Tischzentrifuge, Modell UJ 1, durchgeführt, differentielle Zentrifugationen mit einer SORVALL RC2-B. Für Ultrazentrifugationen wurde die BECKMAN L3-40 oder die Wkf-Kühlzentrifuge, Typ 30 S, benutzt. Die Zentrifugation von Saccharose-Dichtegradienten erfolgte in der BECKMAN L5-75 (Rotor SW 41, 6 x 12 ml). Das Abernten von C.cohnii-Kulturen wurde bei +4°C mit einer Wkf-Zentrifuge, Modell G 50, durchgeführt. Kleine Volumina (< 2 ml), z.B. bei der TCA-Fällung von Proteinproben für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese, wurden in kleinen Plastik-Reagiergefäßen ('Eppendorf-Hütchen') mit einer HERAEUS-CHRIST-Mikro-Hämatokrit zentrifugiert.

2.4.2. LEITFÄHIGKEITSMESSUNGEN

Die Bestimmung der Leitfähigkeit von KCl- oder Kaliumphosphat ($K\text{-}PO_4$)-haltigen Lösungen und Säulenfraktionen erfolgte mit dem Conductivity Meter CDM 3 der Fa.RADIOMETER, Kopenhagen.

2.4.3. pH-MESSUNGEN

Zur Bestimmung des pH-Werts von Puffern und anderen Lösungen diente das PHILIPS pW 9410 digital pH meter.

2.4.4. PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNGEN

Zeitunabhängige Messungen der optischen Dichte bei konstanter Wellenlänge wurden mit einem ZEISS-Spektralphotometer, Typ PMQ II, durchgeführt. Zur photometrischen Ver-

folgung von Enzymaktivitäten und zur Registrierung von Absorptionsspektren diente das ZEISS-Zweistrahl-Spektralphotometer DMR 21 oder das PERKIN-ELMER-Zweistrahl-Photometer, Typ 550, ausgerüstet mit einem ABIMED-Linear-Schreiber. Benutzt wurden Glas- bzw. Quarzküvetten mit 1 cm Lichtweg.

2.4.5. RADIOAKTIVITÄTSBESTIMMUNGEN

Die Zählung radioaktiver Proben erfolgte in einem PACKARD-TriCarb-Flüssigkeitsszintillationsspektrometer, Modell B 2450. Für die Radioaktivitätsmessung von organischen Lösungen wurde Toluol-Szintillator (10 g PPO und 1 g POPOP in 2 l Toluol-dest.) benutzt, für die Bestimmung der Radioaktivität von wässrigen Proben Toluol-Triton-Szintillator (10 g PPO und 1 g POPOP in 1400 ml Toluol-dest. und 600 ml Triton-X100).

2.4.6. GASCHROMATOGRAPHIE UND RADIOGASCHROMATOGRAPHIE

Gaschromatographische und radiogaschromatographische Analysen von Fettsäuremethylester (FSME)-Gemischen wurden mit einem F&M Scientific Research Chromatograph, Typ 5750, der Fa. HEWLETT PACKARD, Düsseldorf, durchgeführt.

2.4.7. ULTRAFILTRATION

Konzentrierung von Proteinsuspensionen mittels Ultrafiltration erfolgte in Zellen und mit Membranen der Fa. AMICON, Witten, nach den Angaben des Herstellers.

2.5. CHEMISCHE SYNTHESEN

2.5.1. DARSTELLUNG VON ACETYL-COENZYM A

Acetyl-CoA wurde hergestellt durch Umsetzung von überschüssigem Essigsäureanhydrid mit freiem CoASH in An-

lehnung an die Methode von SIMON & SHEMIN (1953). Die Reaktion lief ab in 0.1 M $KHCO_3$, pH 8.4, bei 0°C und unter gleichzeitigem Begasen mit Stickstoff (Dauer: 5 - 10 min). Mit Hilfe des Nitroprussid-Natrium-Tüpfeltests nach LYNEN et al. (1951) wurde das Verschwinden von freiem Coenzym A verfolgt (s.u.). Nach dem Abstoppen der Reaktion durch Ansäuern auf pH 2 - 3 wurde nicht umgesetztes Acetanhydrid durch fünfmaliges Ausschütteln des Reaktionsansatzes mit peroxydfreiem Diäthyläther aus der Lösung entfernt.

2.5.2. TÜPFELTEST MIT NITROPRUSSID-NATRIUM-REAGENZ ZUM QUALITATIVEN NACHWEIS VON FREIEM CoASH

- Herstellung des Nitroprussid-Natrium-Reagenz:

  4.5 g Na-Nitroprussid wurden in 15 ml 2 N H_2SO_4 gelöst und mit 90 ml absolutiertem Methanol sowie 30 ml konzentrierter Ammoniaklösung versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert. Lichtgeschützt und in der Kälte aufbewahrt ist die Lösung mehrere Wochen lang verwendbar.

- Durchführung des qualitativen Tests:

  Auf einen Streifen Filterpapier wurden 1 Tropfen Nitroprussid-Natrium-Reagenz und 1 Tropfen des Reaktionsgemischs aus 2.5.1. dicht nebeneinander aufgetragen, so daß die Lösungen ineinander diffundieren konnten. Anschließend wurde über Ammoniakdampf entwickelt. Vorhandensein von freiem CoASH zeigt sich durch sofort auftretende Violettfärbung an.

2.5.3. GEHALTSBESTIMMUNG VON ACETYL-COENZYM A

Die Konzentration des nach 2.5.1. gewonnenen Acetyl-CoA wurde photometrisch bestimmt:

a) anhand der Absorption der Adeninbande bei 260 (ε = 16.4 x 10^3 cm^2/mMol) und
b) anhand der UV-Absorption der Thioesterbande bei 233 nm (ε = 5.4 x 10^3 cm^2/mMol).

Zur Durchführung des benötigten UV-Differenzspektrums s. 2.5.5.
Durch Vergleich der aus a) und b) erhaltenen Konzentrationsangaben kann die Ausbeute der Synthese sowie die Menge an Verunreinigung durch noch vorhandenes freies Coenzym A bestimmt werden. Für die Messung von Fettsäuresynthetase-Aktivitäten wurden nur Acetyl-CoA-Präparationen verwendet, die weniger als 5% an freiem CoASH enthielten.

2.5.4. DARSTELLUNG VON MALONYL-COENZYM A

Malonyl-CoA wurde hergestellt durch Umsetzung von überschüssigem S-Malonyl-N-capryl-cysteamin mit freiem Coenzym A in einer für die kontinuierliche Extraktion mit Äther geeigneten Apparatur nach der Methode von EGGERER & LYNEN (1962). Die Darstellung des S-Malonyl-N-capryl-cysteamin erfolgte ebenfalls nach der in der oben zitierten Arbeit veröffentlichten Vorschrift. Für die Herstellung des S-Malonyl-N-capryl-cysteamin und dessen Umsetzung mit freiem CoASH zur Darstellung des als Substrat für die FAS-Reaktion dienenden Malonyl-CoA wurde nachfolgend skizzierter Syntheseweg eingeschlagen:

1. Cysteamin + Caprylchlorid $\longrightarrow$ N-Capryl-cysteamin,

2. Malonsäure + Thionylchlorid $\longrightarrow$ Malonsäuremonochlorid,

3. N-Capryl-cysteamin + Malonsäuremonochlorid $\longrightarrow$ S-Malonyl-N-capryl-cysteamin

4. S-Malonyl-N-capryl-cysteamin + CoASH $\longrightarrow$ Malonyl-CoA

2.5.5. GEHALTSBESTIMMUNG VON MALONYL-COENZYM A

Konzentration und Ausbeute des nach 2.5.4. hergestellten Malonyl-CoA wurde spektrophotometrisch bestimmt durch Korrelation des Extinktionswerts der Adeninbande bei 260 nm (ε = 16.4 x 10^3 cm^2/mMol) mit dem aus dem UV-Differenzspektrum (s.u.) erhaltenen Wert für die Thioester-

gruppierung (Absorptionsmaximum bei 236 nm, ε = 4.9 x 10^3 cm^2/mMol).

Die Erstellung eines UV-Differenzspektrums folgte der von PODACK (1971) publizierten Methode. Da die Absorption der Thioesterbande bei 236 nm weitgehend durch die Adeninabsorption überlagert wird, mißt man die Extinktion der Thioestergruppierung des Malonyl-CoA bei 236 nm im Zweistrahl-Spektralphotometer gegen einen Referenzwert, der durch Alkali-Behandlung hydrolysiertes Malonyl-Coenzym A enthält. Durch diese Maßnahme kompensiert sich die Adeninabsorption beider Küvetten gegenseitig, und der Extinktionswert der Thioesterbande bei 236 nm läßt sich bestimmen.

Durchführung des UV-Differenzspektrums:

- Küvette 1 (Referenzküvette):

  5 - 20 µl Malonyl-CoA aus 2.5.4. wurden durch Zugabe von 100 µl 4 N KOH 15 min lang bei Raumtemperatur (22°C) hydrolysiert. Nach Abschluß der Hydrolyse wurde durch Zugabe von 100 µl 4 N HCl neutralisiert und das Ganze mit 50 mM Kaliumphosphat-Puffer ($K-PO_4$-Puffer), pH 7.0, auf 2 ml aufgefüllt.

- Küvette 2 (Meßküvette):

  5 - 20 µl Malonyl-CoA wurden durch Zugabe der entsprechenden Menge an 50 mM $K-PO_4$-Puffer, pH 7.0, auf ein Gesamtvolumen von 2 ml aufgefüllt.

Die Messung des UV-Differenzspektrums erfolgte im PERKIN-ELMER-Zweistrahl-Photometer im Bereich zwischen 300 und 210 nm Wellenlänge. Ein Beispiel für eine so erhaltene Absorptionskurve ist in Abb. 2-1 aufgezeichnet.

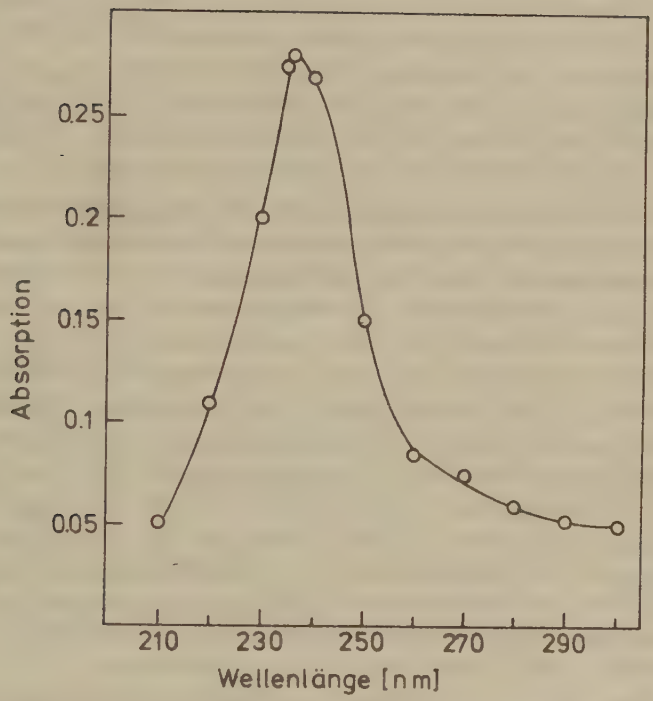


Abb. 2-1: Beispiel eines UV-Differenzspektrums von nach 2.5.4. hergestelltem Malonyl-Coenzym A

2.6. PROTEINBESTIMMUNGEN

Zur routinemäßigen Ermittlung des Proteingehalts wurde die Methode von MURPHY & KIES (1960) angewendet. Dabei wird die Proteinkonzentration einer Lösung aus der Differenz der Absorption bei 215 und 225 nm ermittelt nach der Formel:

$$\frac{\text{mg Protein}}{\text{ml}} = \frac{(OD_{215} - OD_{225}) \times \text{Verdünnung} \times 19.2}{100}$$

Dabei ist zu beachten, daß die Proteinsuspension so verdünnt wird, daß die Differenz aus den beiden OD-Werten zwischen 0.11 und 0.18 liegt (linearer Bereich). Gemessen wurde gegen H_2O-bidest. Als Referenzwert bei der Proteinbestimmung von Enzymen, die in Puffern mit im o.a. UV-Bereich stark absorbierenden Substanzen wie DTE und PMSF suspendiert waren, diente der genauso wie die zu messende Proteinprobe verdünnte entsprechende Puffer.

Die Proteinbestimmung sehr verdünnter Enzymlösungen erfolgte nach der Methode von HEIL & ZILLIG (1970). Dazu wurden jeweils 20 µl Proteinsuspension auf einen Streifen Cellulose-Acetat-Folie aufgebracht und an der Luft trocknen gelassen. Das Ganze wurde anschließend für 30 min in Färbelösung (2.4 g Amidoschwarz in 450 ml Methanol, 100 ml Eisessig und 450 ml H_2O-bidest) überführt, danach in der gleichen Lösung (ohne Amidoschwarz) entfärbt und in Meßlösung, bestehend aus 800 ml Eisessig, 100 ml Ameisensäure, 10 ml 20%ige TCA und 90 ml H_2O-bidest, aufgelöst. Die Absorption der so behandelten Proben wurde durch Vergleich mit Meßlösung bei 600 nm bestimmt. Der Proteingehalt wurde durch Vergleich der erhaltenen Absorptionswerte mit einer mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellten Eichkurve ermittelt.

Während des Reinigungsgangs der Fettsäuresynthetasen aus C.cohnii (s. 3.6.) bzw. S.cerevisiae (s. 3.5.) wurde die Auftrennung der Proteingemische während der benutzten Gelfiltrations- und Chromatographieschritte durch kontinuierliche Registrierung der Absorption bei 280 nm mittels eines mit einem Schreiber gekoppelten Durchflußphotometers (ISCO, Modell UA-5) verfolgt.

Der Proteingehalt der einzelnen Säulenfraktionen wurde aus der Absorptionsdifferenz zwischen 280 und 260 nm nach der von LAYNE (1957) modifizierten Methode von WARBURG & CHRISTIAN (1941) ermittelt. Als Referenzwert wurde der entsprechende Säulenpuffer benutzt. Die Proteinkonzentration läßt sich mit Hilfe nachfolgender Formel berechnen:

$$\text{mg Protein/ml} = 1.55 \times OD_{280} - 0.76 \times OD_{260}.$$

2.7. ENZYMBESTIMMUNGEN

2.7.1. FUMARASE-TEST

Gemessen wurde die Absorptionszunahme bei 240 nm in reduzierten Quarzküvetten bei 30°C. Der Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 1 ml: 0.9 ml 50 mM $K\text{-}PO_4$-Puffer, pH 7.5, 0.05 ml 0.2 M Malat-Lösung (26.8 mg/ml, mit 2 N NaOH auf pH 7.5 eingestellt) und Enzym. Die Referenzküvette enthielt Phosphat-Puffer und Malat. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Enzym gestartet.

2.7.2. CATALASE-TEST

Gemessen wurde die Abnahme der Absorption bei 240 nm in reduzierten Quarzküvetten bei 30°C. Jeder Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 1 ml: 0.98 ml $K\text{-}PO_4$-Puffer mit H_2O_2 (0.12 ml 30%iges H_2O_2 in 100 ml Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.5) und Enzym. Die Vergleichsküvette enthielt Puffer ohne H_2O_2. Gestartet wurde die Reaktion durch die Zugabe von Enzym.

2.7.3. LACTAT-DEHYDROGENASE-TEST (LDH-TEST)

Gemessen wurde der Verbrauch von NADH anhand der Absorptionsabnahme bei 340 nm in reduzierten Glasküvetten bei 30°C. Jeder Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 1 ml: 0.85 ml 0.1 M $K\text{-}PO_4$-Puffer, pH 7.0, 0.05 ml Pyruvat-Lösung (16.5 mg/10 ml), 0.05 ml NADH-Lösung (33 mg/10 ml) und Enzym. Die Referenzküvette enthielt 0.97 ml Phosphat-Puffer und 0.03 ml NADH-Lösung. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Enzym gestartet.

2.7.4. ß-GALACTOSIDASE-TEST

Gemessen wurde das Entstehen von NADH im gekoppelten optischen Test mit Galactose-Dehydrogenase anhand der Absorptionszunahme bei 340 nm. Benutzt wurden reduzierte

Glasküvetten. Die Inkubationstemperatur betrug 30°C. Jeder Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 1 ml: 0.7 ml 0.1 M Kaliumphosphat-Puffer mit Lactose (12 mg/ml Puffer), pH 7.0, 0.05 ml NAD^+-Lösung (3.3 mg/5 ml), 0.05 ml $MgSO_4$-Lösung (25 mg $MgSO_4$ x 7 H_2O in 5 ml H_2O-bidest), 0.003 ml Galactose-Dehydrogenase (BOEHRINGER, unverdünnte Ammoniumsulfatsuspension) und Enzym. Gemessen wurde gegen Puffer ohne Lactose. Der Start erfolgte durch Zugabe von 0.2 ml der zu testenden Enzymfraktion.

2.7.5. 2-ENOYL-CoA-HYDRATASE (CROTONOASE)-TEST (NOYES & BRADSHAW, 1973)

Das Entstehen von NADH wurde anhand der Zunahme der Absorption bei 340 nm im gekoppelten optischen Test mit ß-OH-Acyl-CoA-Dehydrogenase verfolgt. Die Inkubation erfolgte in reduzierten Glasküvetten mit 2 cm Lichtweg bei 30°C. Jeder Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 1 ml: 0.94 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8.9, 0.01 ml 0.1 M NAD^+-Lösung, 0.02 ml ß-OH-Acyl-CoA-Dehydrogenase (2 mg/ml), 0.02 ml 8 mM 2trans-Decenoyl-CoA und Enzym. Die Referenzküvette enthielt 0.99 ml Puffer und 0.01 ml NAD^+-Lösung. Durch Zugabe von 0.01 ml Enzymlösung wurde die Reaktion gestartet.

2.7.6. PROTEASE-BESTIMMUNG IM CASEIN-AGAR-DIFFUSIONSTEST

Die Bestimmung von proteolytischer Aktivität in während des Reinigungsganges der S.cerevisiae- bzw. C.cohnii-FAS erhaltenen Enzymfraktionen wurde mit Hilfe des 'Protease Detection Kits' der Fa. BIO·RAD, München, nach den im Technical Bulletin Nr. 1063 E vom April 1978 gefundenen Angaben des Herstellers durchgeführt.
Die von der Herstellerfirma gelieferten 'Substrate Gel Tablets' ergeben ein ca. 1%iges Agarosegel, das in einer Tris-gepufferten, physiologischen Salzlösung (pH 7.2) Rindercasein als Enzymsubstrat enthält. Proteolytische Aktivität wird auf Agar-Diffusionsplatten sichtbar gemacht, indem sich durch die Ausbreitung der Proteasen

vom Auftragsort aus bei gleichzeitig stattfindender Verdauung des im Gel befindlichen Caseins klare Diffusionshöfe bilden, die sich vom trüben Hintergrund des unverdauten Casein-Agars deutlich abheben. Der nachstehend beschriebene Test wurde in der vorliegenden Arbeit zum semiquantitativen Nachweis von Proteaseaktivität verwendet.

2.7.6.1. Herstellung der Casein-Agar-Diffusionsplatten

Zwei Tabletten aus dem 'Protease Detection Kit' wurden in einem Reagenzglas mit 15 ml H_2O-bidest versetzt und bei Raumtemperatur (22°C) 20 min lang quellen gelassen. Die entstandene trübe Suspension wurde kräftig durchgemischt und für 3 - 5 min in ein kochendes Wasserbad gestellt, um den Agar aufzulösen. Danach wurde die Suspension erneut kräftig gemischt und auf 55 - 60°C abgekühlt. Die nun milchig-klare Lösung wurde auf Plastik-Diffusionsplatten (8.2 x 6.3 cm^2) aufgetragen und bei Raumtemperatur erstarren lassen. Das fertige Agarosegel besaß eine Schichtdicke von 3 mm. Für die Aufnahme der zu analysierenden Proben wurden mit einem 4-mm-Locheisen in jeweils 1 - 1.5 cm Abstand voneinander Löcher in den Agar gestanzt, in die bis zu 35 µl Enzymlösung eingebracht werden konnte.

2.7.6.2. Durchführung des Proteasetests

Auf einer Casein-Agar-Diffusionsplatte konnten maximal 30 Proben gleichzeitig getestet werden. Nach Zugabe der Enzymsuspension (bis zu 35 µl/Loch) wurden die Platten je nach Ausmaß der Proteinase-Aktivität zwischen 2 und 24 h bei Raumtemperatur (22°C) inkubiert. Durch Überschichten der Testplatten mit 3%iger Essigsäure wurde die Reaktion gestoppt.

2.7.6.3. Auswertung des Proteasetests

Nach Beendigung der Inkubation wurde der Durchmesser der proteolytischen Höfe, die um den Auftragsort herum ent-

standen waren, ausgemessen. Die Proteaseaktivität von Enzymfraktionen wurde ausgedrückt als cm Durchmesser ("cm Hof-ø") des proteolytischen Hofes pro eingesetzte Proteinmenge und Inkubationszeit.

2.7.7. BESTIMMUNG DER ENZYMAKTIVITÄT DER S.CEREVISIAE-FAS

2.7.7.1. Radioaktiver FAS-Test

Das Prinzip des Tests (modifiziert nach LYNEN, 1969) beruht auf der Bestimmung des durch die FAS-Reaktion in langkettige Fettsäure-CoA-Ester eingebauten radioaktiven Kohlenstoffes, wobei (2-^{14}C)-Malonyl-CoA als Substrat fungiert.

Für die radioaktiven Enzymtests wurden durch Schliffstopfen verschließbare, dickwandige Zentrifugengläser verwendet. In einem Gesamtvolumen von 2 ml befanden sich: 0.1 M K-PO_4-Puffer, pH 6.6, 10 mM Cystein (oder 4 mM DTE), 0.3 mg/ml BSA, 1.25 mM NADPH, 0.22 mM Acetyl-CoA, 0.07 mM (2-^{14}C)-Malonyl-CoA (1950 cpm/nMol) und Enzym. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Malonyl-CoA gestartet. Es wurde bei 30°C 15 bis 30 min lang inkubiert.
Durch Zugabe von 1 ml 10%iger methanolischer KOH wurde die Reaktion abgestoppt, 50 µl einer Mischung aus geradzahligen, langkettigen Fettsäuren wurden zugegeben (Fettsäuren-Mix: je 2 mg/ml von $C_{10:0}^-$, $C_{12:0}^-$, $C_{14:0}^-$, $C_{16:0}^-$ und $C_{18:0}^-$-Säure in abs. Methanol) und der Ansatz 60 min lang bei 70°C oder über Nacht (mindestens 16 h) bei Raumtemperatur hydrolysiert. Anschließend wurde mit 6 N HCl auf pH 2.0 angesäuert und die Reaktionsprodukte durch fünfmaliges Ausschütteln mit n-Pentan in die organische Phase überführt. Die vereinigten Pentanextrakte wurden einmal mit 10 ml 1 N Essigsäure und dreimal mit jeweils 5 ml H_2O-bidest gewaschen. Anschließend wurde das Pentan bei Raumtemperatur an einem BÜCHI-ROTAVAPOR, Typ R, bis zur Trockne abgezogen, der die Fettsäuren enthaltende Rückstand in 10 ml Toluol-Szintillator aufgenommen und die Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer bestimmt.

Die enzymatische Aktivität wurde ausgedrückt als nMole inkorporiertes Malonyl-CoA pro min bei 30°C. 1 milliunit (mU) ist die Enzymmenge, die unter den Bedingungen des Tests 1 nMol Malonyl-CoA pro min umsetzt.

2.7.7.2. Spektrophotometrischer FAS-Test

Bei der Reinigung der FAS aus S.cerevisiae wurde die Enzymaktivität in den einzelnen Fraktionen durch den photometrischen Test nach STOOPS et al. (1978a)bestimmt. Gemessen wurde in einem Zweistrahl-Spektralphotometer der NADPH-Verbrauch der Reaktion anhand der Abnahme der Extinktion bei 340 nm. Benutzt wurden auf 30°C thermostatisierte Glasküvetten. Jeder Testansatz enthielt (in 1 oder 2 ml Volumen):
0.1 M K-PO_4-Puffer, pH 6.6, 2.5 mM EDTA-Na_2, 4 mM DTE, 0.3 mg/ml BSA, 0.14 mM NADPH, 0.18 mM Acetyl-CoA, 0.09 mM Malonyl-CoA und Enzym. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Malonyl-CoA gestartet.
Die enzymatische Aktivität (in mU) wurde ausgedrückt als nMole umgesetztes Malonyl-CoA pro min bei 30°C. 1 nMol umgesetztes Malonyl-CoA entspricht dabei dem Verbrauch von 2 nMol NADPH (= Abnahme der Extinktion bei 340 nm von 0.006), LYNEN (1969).

2.7.8. BESTIMMUNG DER ENZYMAKTIVITÄT DER C.COHNII-FAS

2.7.8.1. Radioaktiver FAS-Test

Wegen des im Vergleich zur Fettsäuresynthetase aus S.cerevisiae geringen enzymatischen Umsatzes der C.cohnii-FAS wurde für routinemäßige Enzymbestimmungen nachfolgend beschriebenes Testsystem mit (2-^{14}C)-Malonyl-CoA als Substrat entwickelt.
Jeder Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 1 ml (bei Aktivitätsbestimmungen von stark verdünnten Enzymlösungen in 2 ml):
0.1 M Tris-HCl-Puffer, pH 8.3, 0.1 M KCl, 2 mM EDTA-Na_2, 5 mM DTE, 0.3 mg/ml BSA, 0.2 mM NADPH, 0.2 mM NADH, 0.075 mM Acetyl-CoA und Enzym.

Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von 30 µl 5 mM (2-^{14}C)-Malonyl-CoA (520-650 cpm/nMol).

Vorgehen:
Das Enzym wurde in Puffer mit KCl, EDTA, DTE und BSA 30 min lang bei Raumtemperatur (22°C) vorinkubiert, dann mit NADPH, NADH und Acetyl-CoA versetzt, und die Reaktion durch Zugabe des radioaktiven Malonyl-CoA gestartet. Es wurde 10 - 45 min bei Raumtemperatur (22°C) inkubiert (linearer Bereich). Durch Zusatz von 50 µl 4 N HCl/ml Test wurde die Reaktion beendet. Nach Versetzen des Ansatzes mit 50 µl Fettsäuren-Mix aus 2.7.7.1. oder 50 µl C.cohnii-Fettsäuren-Mischung (= 2 mg jeder Fettsäure pro ml, von $C_{10:0}$- bis $C_{22:0}$-Säure, in abs. Methanol) wurde dreimal mit je 3 ml n-Pentan/ml Testvolumen ausgeschüttelt (entspricht der Extraktion von 75% der insgesamt in die organische Phase überführbaren Radioaktivität). Die Trennung von Pentan- und Wasserphase erfolgte durch 10minütiges Zentrifugieren in einer HERAEUS-CHRIST-Tischzentrifuge. Die Pentanextrakte wurden vereinigt und bei Raumtemperatur am Rotationsverdampfer bis zur Trockne abgezogen. Der die radioaktiv markierten, neu synthetisierten Fettsäuren enthaltende Rückstand wurde in 10 ml Toluol-Szintillator aufgenommen und die Reaktionsausbeute im Szintillationsspektrometer bestimmt. Die Aktivität der C.cohnii-FAS wird in µU (microunits) angegeben. Dabei entspricht 1 µU derjenigen Enzymmenge, die unter den o.a. Testbedingungen 1 pMol Malonyl-CoA/min verbraucht.

2.7.8.2. Spektrophotometrischer FAS-Test

Der im folgenden beschriebene optische FAS-Test konnte, bedingt durch die im Vergleich zur Hefe-FAS um das 3-400fache niedrigere Enzymaktivität der C.cohnii-FAS, nur bei stark angereinigten Enzymfraktionen verwendet werden und war daher für die routinemäßige Ermittlung der FAS-Aktivität während des Reinigungsganges nicht geeignet.
Gemessen wurde der Gesamtumsatz der Fettsäuresynthetase anhand des NADPH/NADH-Verbrauchs der beiden Reduktions-

schritte durch Verfolgung der Absorptionsabnahme bei 340 nm. Benutzt wurden auf 25°C thermostatisierte reduzierte Glasküvetten. Die optische Messung erfolgte im PERKIN-ELMER-Zweistrahl-Spektralphotometer gegen einen Referenzwert, der sämtliche Substanzen außer Enzym enthielt.

Vorgehen:
Die Enzymprobe wurde im kompletten Ansatz (Zusammensetzung s. 2.7.8.1., "Radioaktiver FAS-Test"), aber ohne Acetyl- und Malonyl-CoA, 30 min lang bei 25°C vorinkubiert. Während dieser Zeit wurde die Absorptionsabnahme bei 340 nm ('blank decrease') registriert, um die die eigentliche, mit Acetyl- und Malonyl-CoA gemessene Enzymaktivität korrigiert werden muß. Gestartet wurde die FAS-Reaktion durch gleichzeitige Zugabe der beiden Substrate. Die Konzentrationen von Acetyl- und Malonyl-CoA waren im optischen Test auf 0.1 bzw. 0.4 mM erhöht.

2.7.9. BESTIMMUNG DER ß-KETOACYL-REDUKTASE-TEILAKTIVITÄT DER FAS AUS S.CEREVISIAE

Die Messung des 1. Reduktionsschrittes der Hefe-FAS erfolgte spektrophotometrisch nach LYNEN (1969), wobei die NADPH-abhängige Reduzierung von S-Acetoacetyl-N-acetylcysteamin anhand der Extinktionsabnahme bei 340 nm verfolgt wurde. Gemessen wurde bei 30°C in thermostatisierten reduzierten Glasküvetten.
Jeder Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 1 ml: 0.1 M K-PO_4-Puffer, pH 6.6, 5 mM DTE, 0.2 mM NADPH und Enzym. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl einer 0.1 M S-Acetoacetyl-N-acetyl-cysteamin-Lösung gestartet. Gemessen wurde gegen einen Leerwert ohne Enzym.

2.7.10. BESTIMMUNG DER ß-KETOACYL-REDUKTASE-TEILAKTIVITÄT DER FAS AUS C.COHNII

Gemessen wurde der Verbrauch von NADH bei 340 nm durch den 1. Reduktionsschritt der C.cohnii-FAS-Reaktion. Benutzt wurden auf 25°C thermostatisierte Glasküvetten. Das Testvolumen betrug 2 ml und enthielt:

0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM DTE, 0.4 mM NADH und Enzym. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 0.1 M S-Acetoacetyl-N-acetyl-cysteamin gestartet. Die Referenzküvette enthielt den gleichen Ansatz ohne Enzym.

2.7.11. BESTIMMUNG DER THIOESTERASE-TEILAKTIVITÄT DER C.COHNII-FAS

Der nach der Methode von BARNES (1975) durchgeführte optische Test basiert auf der Bestimmung des bei der Hydrolyse von Acyl-CoA-Estern freigesetzten CoASH, gemessen anhand der Reduzierung von DTNB (Ellman's Reagenz) durch die Thiolgruppe des Coenzym A. Gemessen wurde die Zunahme der Absorption bei 412 nm in auf 25°C thermostatisierten Glasküvetten. Jeder Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 2 ml:
0.1 M Tris-HCl, pH 8.6, 20 µM Acyl-CoA-Ester, 0.2 mg/ml BSA und 0.2 mM DTNB.
Die Reaktion wurde durch den Zusatz von Enzym gestartet.

2.8. RADIOGASCHROMATOGRAPHISCHE ANALYSE DER ^{14}C-MARKIERTEN ENDPRODUKTE DER FAS-REAKTION

2.8.1. HERSTELLUNG VON DIAZOMETHAN

3 KOH-Plätzchen wurden in 1.5 ml H_2O-bidest gelöst, mit 13.5 ml abs. Äthanol versetzt und die Lösung in Eis aufbewahrt. In einem für die spätere Destillation geeigneten Rundkolben wurden 3 g Diazoreagenz (N-Methyl-N-nitroso-p-toluolsulfonamid) in 40 ml peroxydfreiem Diäthyläther gelöst und ebenfalls ins Eis gestellt. Nach einer Abkühlungszeit von ca. 5 min wurden beide Lösungen vereinigt, das entstandene Diazomethan wurde bei 40°C überdestilliert und bis zum Gebrauch bei 0°C aufbewahrt. Das Reagenz ist unter diesen Bedingungen mehrere Stunden lang verwendbar.

2.8.2. VERESTERUNG FREIER FETTSÄUREN MIT DIAZOMETHAN

Nach fünfmaliger Pentanextraktion von radioaktiven FAS-Tests nach 2.7.7.1. bzw. 2.7.8.1. wurden die vereinig-

ten organischen Phasen am Rotationsverdampfer abgezogen. Der die ^{14}C-markierten langkettigen Fettsäuren enthaltende Rückstand wurde in 1 ml Pentan aufgenommen und solange mit Diazomethan versetzt, bis die gelbe Färbung erhalten blieb (= vollständige Veresterung). Das Diazomethan wurde am ROTAVAPOR im Eisbad bis zur Trockne abgezogen, der die Fettsäuremethylester (FSME) enthaltende Rückstand in 100 µl Benzol-dest. aufgenommen und in ein kleines Reagiergefäß überführt. Das Benzol wurde bei Raumtemperatur vorsichtig mit N_2 verblasen und der Rückstand erneut in 10 - 20 µl Benzol aufgenommen. Ein Viertel des Volumens wurde zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität in 10 ml Toluol-Szintillator gezählt, der verbliebene Rest der radiogaschromatographischen Analyse unterzogen.

2.8.3. RADIOGASCHROMATOGRAPHIE DER FETTSÄUREMETHYLESTER

Die Trennung der mit radioaktivem Kohlenstoff markierten individuellen Fettsäuremethylester erfolgte in 15% DEGS (Diäthylen-glycol-succinat) auf Chromosorb W-AW-DMCS, 80 - 100 mesh, als stationäre Phase. Die Säulenlänge betrug 1.8 m, ihr Innendurchmesser 4 mm. Als Trägergas wurde N_2 verwendet (Flußrate: 40 ml/min). Für die radiogaschromatographische Analyse war das Gerät mit einem zusätzlichen beheizten Ausgang (200°C) versehen, über den etwa 80% des Gasstroms geführt wurden. An diesem Ausgang wurden ca. 6 cm lange Teflonschläuche befestigt, die nach jeder Fraktion gewechselt wurden. Durch die Schläuche wurde der Gasstrom direkt in Szintillationsgläschen eingeleitet, die bereits je 10 ml Toluol-Szintillator enthielten. Fraktioniert wurde entsprechend den mit einem Schreiber registrierten Massenpeaks der als Träger- und Referenzsubstanzen dienenden, beim Abstoppen des Enzymtests zugegebenen Fettsäuren (s. 2.7.7.1. bzw. 2.7.8.1.).

Temperaturprogramm: 4 min bei 140°C, dann Aufheizen mit 4°C/min bis auf 210°C, anschließend 30 min bei 210°C.

2.9. ANALYSE DES FETTSÄUREMUSTERS VON LIPIDEXTRAKTEN

2.9.1. LIPIDEXTRAKTION

Die Extraktion der Gesamtlipide aus C.cohnii folgte der von KATES (1972) modifizierten Originalvorschrift von BLIGH & DYER (1959).

Beispiel:
5 g C.cohnii-Zellen (Feuchtgewicht) wurden mit 1.5 ml H_2O-bidest und 15 ml Methanol/Chloroform-Mischung (2:1, v/v) versetzt und unter N_2-Atmosphäre 3 h lang bei Raumtemperatur (22°C) in einem mit Schliffstopfen verschlossenen 20-ml-Zentrifugenglas gerührt. Anschließend wurde für 10 min in der Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand in ein verschlossenes Gefäß überführt und das Sediment mit 19 ml Methanol/Chloroform/H_2O (2:1:0.8, v/v/v) wie oben extrahiert und zentrifugiert. Die Überstände wurden in einem Scheidetrichter vereinigt und das Ganze durch Ausschütteln mit 12 ml Chloroform und 14 ml H_2O-bidest in ein binäres Phasensystem transferiert. Nach erfolgter Phasentrennung wurde das unten befindliche Chloroform in einen Rundkolben abtropfen lassen, mit 5 ml Benzol zur Entfernung von Wasserspuren versetzt und am Rotationsverdampfer bei 30 - 35°C bis zur Trockne abgezogen. Der Lipidrückstand (98 mg) wurde in 9.8 ml Chloroform oder Benzol aufgenommen (= 1%ige Lipidstammlösung) und unter Stickstoff bei -20°C aufbewahrt.

2.9.2. DARSTELLUNG VON FETTSÄUREMETHYLESTERN AUS LIPIDEXTRAKTEN

Die innerhalb von 20 min abgeschlossene Umesterung aller Lipidklassen, alkali-katalysiert durch Behandlung mit 2 N Natrium-Methylat, wurde nach der von CHRISTIE (1972) veröffentlichten Methode durchgeführt.

Beispiel:
10 mg C.cohnii-Lipide aus 2.9.1. wurden mit 0.5 mg $C_{17:0}$-OCH_3 und/oder 0.5 mg $C_{21:0}$-Methylester als internem Standard versetzt und bei 35°C im N_2-Strom bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in 2 ml Dichlor-

methan aufgenommen und mit 4 ml 2 N Na-Methylat versetzt. Die homogene Mischung wurde bei Raumtemperatur stehengelassen und während der 20minütigen Reaktionsdauer einige Male kräftig geschüttelt. Durch die Zugabe von 8 ml 20%iger Essigsäure wurde die Reaktion abgestoppt und die untere organische Phase mit einer Pasteurpipette entnommen. Die wässrige Oberphase wurde dann dreimal mit je 8 ml n-Hexan ausgeschüttelt. Die organischen Extrakte wurden vereinigt, mit H_2O-bidest neutralgewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Ganze wurde anschließend am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt und der Rückstand in 0.1 ml Benzol wieder aufgenommen.

2.9.3. QUANTITATIVE GASCHROMATOGRAPHIE DER FETTSÄUREMETHYLESTER

Die quantitative Analyse der aus C.cohnii-Lipiden nach 2.9.2. gewonnenen Fettsäuremethylester (FSME) erfolgte auf 6% oder 12% DEGS-Säulen (s.a. 2.8.3.) mit einer Länge von 240 cm und einem Innendurchmesser von 0.26 cm unter Verwendung von Stickstoff als Trägergas (Flußrate: 40 ml/min). Als interne Standards dienten die der Transesterifizierung zugesetzten ungeradzahligen FSME (s. 2.9.2.). Die individuellen, gesättigten und ungesättigten FSME aus C.cohnii wurden durch Vergleich ihrer Retentionszeiten mit denen von bekannten Fettsäuremethylestern identifiziert. Die quantitative Auswertung der Massenpeak-Flächen erfolgte nach der Höhe x Halbwertsbreite-Bestimmungsmethode.

Temperaturprogramm: 20 min bei 100°C, dann aufgeheizt mit 4°C/min bis auf 210°C, danach 20 - 30 min bei 210°C.

2.10. ANALYTISCHE POLYACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESEN

2.10.1. POLYACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESE UNTER DENATURIERENDEN BEDINGUNGEN (SDS-PAGE)

Für die elektrophoretische Auftrennung von SDS-behandelten Proteingemischen wurde das diskontinuierliche Slab-

gel-System nach LÄMMLI (1970) verwendet. Die für die Plattengele benutzte Elektrophoreseapparatur entsprach der von STUDIER (1973) beschriebenen. Die das Trenn- und das Sammelgel aufnehmende Kammer besaß die Maße: 10 x 13 x 0.2 cm^3 oder 10 x 13 x 0.4 cm^3.

2.10.1.1. Lösungen

1. Trenngelpuffer:
   181.7 g Tris/l (mit HCl-konz. eingestellt auf pH 8.8)
2. Sammelgelpuffer:
   60.6 g Tris/l (mit HCl-konz. eingestellt auf pH 6.8)
3. Acrylamid-Lösung, 20%ig:
   200 g Acrylamid (2 x umkristallisiert) und 5.33 g Bisacrylamid pro Liter H_2O-bidest
4. Ammoniumpersulfat-Lösung, 10%ig:
   100 mg $(NH_4)_2S_2O_8$ in 1 ml H_2O-bidest
5. SDS-Lösung, 20%ig:
   20 g Na-Dodecylsulfat in 100 ml H_2O-bidest
6. Probenpuffer (zur Proteindenaturierung):
   10 ml Glycerin, 5 ml ß-Mercaptoäthanol, 3 g SDS, 12.5 ml Sammelgelpuffer und 2 g BPB (Bromphenolblau) in 100 ml H_2O-bidest
7. Elektrodenpuffer:
   6 g Tris, 28.8 g Glycin und 1 g SDS pro Liter, pH 8.3
8. Färbelösung (zur Proteinanfärbung):
   2.5 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 455 ml Methanol, 90 ml Eisessig; mit H_2O-bidest auf 1 l
9. Entfärbelösung:
   300 ml Methanol, 75 ml Eisessig; mit H_2O-bidest auf 1 l

2.10.1.2. Gelmischungen

Slabgele mit unterschiedlichen Polyacrylamid-Konzentrationen in Trenn- und Sammelgel wurden nach untenstehenden Mischungstabellen aus den unter 2.10.1.1. beschrie-

benen Lösungen hergestellt. Die gemachten Angaben beziehen sich auf Gele mit 2 mm Stärke. Für 4 mm dicke Slabgele müssen die eingesetzten Volumina verdoppelt werden, um die Konzentrationen der einzelnen Komponenten konstant zu halten.

A) Trenngelmischungen:

Lösungen (s.2.10.1.1.)	ml Lösung/Gel bei gewünschter Acrylamid-Konzentration im Trenngel von:			
	10%	7.5%	6%	5%
1.	7.5	7.5	7.5	7.5
3.	15.0	11.25	9.0	7.5
4.	0.2	0.2	0.2	0.2
5.	0.225	0.225	0.225	0.225
TEMED	0.02	0.02	0.02	0.02
H_2O-bidest	7.5	11.25	13.5	15.0

B) Sammelgelmischungen:

Lösungen (s.2.10.1.1.)	ml Lösung für Sammelgel bei Acrylamid-Konzentration im Trenngel von:	
	10% und 7.5%	6% und 5%
2.	4.0	4.0
3.	4.0	3.0
4.	0.16	0.16
5.	0.24	0.24
TEMED	0.016	0.016
H_2O-bidest	7.76	8.76

2.10.1.3. Durchführung

Die Elektrophoresekammer wurde 9-10 cm hoch mit einer der unter 2.10.1.2. beschriebenen Trenngelmischungen gefüllt, mit einer Pasteurpipette vorsichtig mit etwa

1 ml 0.1%iger SDS-Lösung überschichtet und bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach erfolgter Polymerisation (ca. 1-2 h) wurde die überstehende SDS-Lösung abgegossen und die Kammer entsprechend Tabelle B aus 2.10.1.2. bis zum Rand mit einer der dort angegebenen Sammelgelmischungen gefüllt. Ein als Taschenformer dienender Plexiglaskamm wurde eingesetzt (10 Taschen pro Gel mit einem Probenfüllvolumen von maximal 90 µl bei 2 mm dicken Gelen bzw. 200 µl bei 4-mm-Gelen) und das Ganze bei Raumtemperatur polymerisieren lassen. Nach dem Festwerden wurde der Kamm vorsichtig aus dem Sammelgel entfernt und die Kammer an die Elektrophoreseapparatur angeschlossen.

Vor dem Auftragen wurden die zu analysierenden Proteinproben mit einem gleich großen Volumen an Probenpuffer versetzt und 15 min lang bei 100°C denaturiert.

Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur (ohne Kühlung) bei einer konstanten Stromstärke von 24 mA (Dauer ca. 5 h), bis die Bromphenolblau-Bande den unteren Rand des Trenngels erreicht hatte.

Es wurde mindestens 3 h lang mit Lösung 8. aus 2.10.1.1. angefärbt. Anschließend wurde die überschüssige Farbe bei 40°C unter mehrfachem Wechseln von Lösung 9. aus 2.10.1.1. entfernt. Durch Zugabe von jeweils einer Spatelspitze DOWEX 1 (Cl^--Form) zum Entfärbebad kann der Vorgang beschleunigt werden. Die Gele wurden, um ein Schrumpfen zu verhindern, bis zur photographischen Dokumentation in 10%iger Essigsäure aufbewahrt.

2.10.2. GELELEKTROPHORESE IN POLYACRYLAMID-KONZENTRATIONS-GRADIENTEN UNTER NATIVEN BEDINGUNGEN (SYSTEM I)

Zur elektrophoretischen Analyse von während des Reinigungsganges für die Hefe-FAS bzw. die C.cohnii-FAS anfallenden Proteinfraktionen unter nativen Bedingungen wurde routinemäßig das von RÜCHEL & GROSS (1979) veröffentlichte Gradientengelverfahren für Slabgele angewendet. Zur Durchführung der Elektrophorese diente wie in 2.10.1. die Apparatur nach STUDIER (1973).

Es wurden Gele mit linearen Acrylamid-Konzentrationsgradienten von 3-30% bzw. 3-20% gefahren. Die die entsprechenden Gelmischungen beinhaltende Elektrophoresekammer maß 10 x 13 x 0.4 cm^3.

2.10.2.1. Lösungen

1. Acrylamid-Lösung, 50%ig:
   48.75% (w/v) Acrylamid (2 x umkristallisiert) und 1.25% Bisacrylamid in H_2O-bidest (ergibt 50% Gesamtacrylamid mit 2.5% cross-linkage)
2. Gelpuffer:
   2.5 M Tris-HCl, pH 8.4
3. TEMED-Lösung:
   1.5% (v/v) TEMED in H_2O-bidest
4. Bromphenolblau-Lösung:
   0.1% (w/v) BPB in H_2O-bidest
5. Ammoniumpersulfat-Lösung:
   0.3% (w/v) $(NH_4)_2S_2O_8$ in H_2O-bidest
6. Elektrodenpuffer:
   12.11 g Tris lösen in 1900 ml H_2O-bidest, mit ca. 3 g Borsäure auf pH 8.4 bringen, mit H_2O-bidest auf 2 l auffüllen
7. Probenpuffer:
   5 Teile Glycerin + 2 Teile 0.2%ige BPB-Lösung in H_2O-bidest
8. Färbelösung:
   2.9 g Amidoschwarz, 100 ml Methanol, 27 ml Eisessig; mit H_2O-bidest auf 1 l auffüllen
9. Entfärbelösung:
   Methanol/Eisessig/Wasser = 1 : 1.5 : 17.5

2.10.2.2. Gelmischungen

A) 'High-density-mixture' (20% bzw. 30% an Acrylamid):

20 bzw. 30 ml Lösung 1. (Lösungen: s. 2.10.2.1.)
2.5 ml Lösung 2.
2.5 ml Lösung 3.
2.5 ml Lösung 4.
2.5 ml Lösung 5.
Das Ganze mit H_2O-bidest auf 50 ml auffüllen.

b) 'Low-density-mixture' (mit 3% Acrylamid):

3 ml Lösung 1. (Lösungen: s. 2.10.2.1.)
2.5 ml Lösung 2.
5.0 ml Lösung 3.
5.0 ml Lösung 5.
Das Ganze mit H_2O-bidest auf 50 ml Volumen bringen.

2.10.2.3. Durchführung

Die beiden Gelmischungen (A bzw. B aus 2.10.2.2.) wurden getrennt voneinander in zwei im Eis stehende 100-ml-Erlenmeyerkolben gegeben und anschließend bei +4°C in einer vorgekühlten Elektrophoresekammer wie unten beschrieben gemischt. Dazu wurde die senkrecht gestellte Kammer zu 40% ihres Fassungsvermögens mit Mischung A gefüllt. Nachfolgend wurde mit der gleichen Menge an Mischung B vorsichtig überschichtet. Durch 10maliges Hin- und Herklappen der nun zu 80% gefüllten Gelkammer bis jeweils fast in die Waagerechte wurden die beiden Anteile so miteinander vermischt, daß sich ein über weite Bereiche des Gels linearer Acrylamid-Konzentrationsgradient ausbildete. Anhand der Verteilung des in der 'High-density-mixture' (A) enthaltenen blauen Farbstoffes kann der Mischungsvorgang visuell verfolgt werden. Danach wurde die Kammer aufrecht hingestellt, ihr Inhalt vorsichtig mit ca. 2 ml H_2O-bidest überschichtet und das Ganze noch 30 min lang bei +4°C belassen. Die Polymerisation erfolgte anschließend bei Raumtemperatur. Nach dem Festwerden des Gels wurde das überstehende Wasser abgegossen, die Kammer nun bis zum Rand mit

der in Eis aufbewahrten Mischung B (s. 2.10.2.2.) gefüllt, der Taschenformer ("Kamm") eingesetzt und das Ganze bei Raumtemperatur polymerisieren lassen. Ein fertiges Gradientengel enthält 10 Taschen, die jeweils für maximal 200 µl Probenvolumen Platz bieten.

Das Gel wurde an die Elektrophoreseapparatur angeschlossen und im Kühlraum eine halbe Stunde lang bei 100 Volt voräquilibriert. Anschließend wurden die mit 10 µl Probenpuffer (Lösung 7. aus 2.10.2.1.) pro 100 µl Probe versetzten Proteinsuspensionen durch Unterschichten des Elektrodenpuffers in die einzelnen Geltaschen gefüllt und bei 100 Volt einwandern lassen. Die Elektrophorese erfolgte dann für 16-18 h bei einer konstanten Spannung von 150 Volt im Kühlraum.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus der Kammer entfernt, 30 min lang bei Raumtemperatur mit Lösung 8. aus 2.10.2.1. angefärbt und anschließend bei 40°C unter mehrfachem Wechseln des Entfärbers von überschüssigem Farbstoff befreit. Die Gele wurden in 10%iger Essigsäure bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.10.3. GELELEKTROPHORESE IN POLYACRYLAMID-KONZENTRATIONS-GRADIENTEN UNTER NATIVEN BEDINGUNGEN (SYSTEM II)

Zur Analyse von gereinigter C.cohnii-FAS wurden auch fertig gegossene Gradientengele (Slabgele) der Fa. PHARMACIA FINE CHEMICALS, Uppsala/Schweden, benutzt. Die native Elektrophorese erfolgte in der Apparatur nach STUDIER (1973) nach den Angaben des Herstellers. Verwendet wurden PAA 4/30-Gele mit 4-30% Acrylamid (Trennkapazität lt. Angaben der Lieferfirma: 5×10^4 bis 2×10^6 Dalton). Die beiden Glasplatten, zwischen denen sich das fertige Gradientengel befand, standen am oberen Ende ca. 0.5 cm über. Dieser Zwischenraum wurde mit einem Taschengel gefüllt (s.u.), das die zu untersuchenden Proteinproben aufnehmen konnte (6 Taschen/Gel mit einem Fassungsvermögen von maximal 90 µl).

2.10.3.1. Taschengel-Lösungen

1. Acrylamid-Lösung, 30%ig:
   30 g Acrylamid und 0.8 g Bisacrylamid in 100 ml H_2O-bidest
2. Gelpuffer:
   0.1 g H_3BO_3 und 0.1 g EDTA-Na_2 in 100 ml H_2O-bidest
3. Ammoniumpersulfat-Lösung:
   0.7 mg $(NH_4)_2S_2O_8$ pro ml Gel

Zur Herstellung eines 3%igen Taschengels wurden 0.5 ml Acrylamid-Lösung mit 4.5 ml Gelpuffer verdünnt.

2.10.3.2. Lösungen für Elektrophorese und Proteinfärbung

1. Elektrodenpuffer:
   10.91 g Tris, 4.94 g H_3BO_3 und 0.93 g EDTA-Na_2 in 1 l H_2O-bidest; der pH-Wert beträgt 8.4
2. Probenpuffer:
   5 Teile Glycerin und 2 Teile BPB-Lösung (s.2.10.2.1.)
3./4. Färbelösung und Entfärbelösung:
   Die verwendeten Lösungen entsprechen den unter 2.10.1.1. beschriebenen.

2.10.3.3. Durchführung

Vor dem Probenauftrag wurde das mit dem Taschengel überschichtete Gradientengel bei +4°C für 15 min bei 125 Volt voräquilibriert. Anschließend wurden die zu analysierenden Proteinproben (10%ig an Probenpuffer, s.a. 2.10.2.3.) durch Unterschichten des Elektrodenpuffers in die Taschen gefüllt. Die Einwanderung erfolgte bei 70 Volt. Danach wurde 15 h lang bei +4°C und einer konstanten Spannung von 150 Volt elektrophoretisiert (= 2250 V x h). Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel wie in 2.10.1.3. beschrieben gefärbt und entfärbt.

2.10.4. KONTINUIERLICHE POLYACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESE UNTER DENATURIERENDEN BEDINGUNGEN (SDS/HARNSTOFF-PAGE)

Die SDS/Harnstoff-Polyacrylamidgel-Elektrophorese stellt eine von K. ALTENDORF und Mitarbeitern, Ruhr-Universität Bochum, ausgearbeitete und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellte Modifizierung des ursprünglich von LÄMMLI (1970) publizierten Elektrophoresesystems dar (s.a. 2.10.1.). Diese Methode fand vor allem bei der gelelektrophoretischen Analyse von während des Reinigungsganges der C.cohnii-FAS anfallenden Enzymfraktionen Verwendung und erwies sich hier als der SDS-PAGE nach 2.10.1. überlegen (s. 3.6.8.).

Die SDS/Harnstoff-PAGE wurde im Gegensatz zu dem unter 2.10.1. gesagten in Glasröhrchen mit einem Innendurchmesser von 6 mm ausgeführt und enthielt kein Sammelgel.

2.10.4.1. Lösungen

1. Acrylamidlösung, 30%ig:
   30 g Acrylamid (2x umkristallisiert) und 1.5 g Bisacrylamid mit H_2O-bidest auf 100 ml auffüllen
2. Gelpuffer:
   1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 2% SDS (Endkonzentration im Gel: 0.375 M Tris-HCl und 0.5% SDS)
3. Probenpuffer:
   0.5 M Tris-HCl, pH 6.8
4. Elektrophoresepuffer:
   0.025 M Tris (3.03 g/l), 0.192 M Glycin (14.41 g/l) und 0.2% (2 g/l) SDS; der pH-Wert des Puffers liegt bei genauer Einwaage zwischen 8.2 und 8.3.
5. Ammoniumpersulfat-Lösung, 10%ig:
   100 mg $(NH_4)_2S_2O_8$ in 1 ml H_2O-bidest
6./7. Färbe und Entfärbelösung:
   Die Lösungen entsprechen den unter 2.10.1. genannten (s. 2.10.1.1., Lösung 8 und 9).

2.10.4.2. Gelmischungen (für 6 und 6.5%ige Acrylamidgele)

Für 6.5%ige Gele wurden 6.5 ml Lösung 1. und 6.5 ml H_2O-

bidest vermischt (für 6%ige Gele 6 ml Lösung 1. und 7 ml H_2O-bidest) und mit 7.5 ml Gelpuffer versetzt. Nach Zugabe von 14.41 g Harnstoff (BIO·RAD, 'electrophoresis purity grade') wurde das Ganze auf einem Magnetrührer bei Raumtemperatur gerührt, bis der Harnstoff vollständig gelöst war. Anschließend wurden 4 µl TEMED hinzupipettiert und die Lösung ca. 5 min lang am Wasserstrahlvakuum entlüftet. 0.225 ml Lösung 5. wurden dazugegeben und die fertige Gelmischung in die an einem Ende durch PARAFILM verschlossenen Glasröhrchen gefüllt (Höhe: 8 bis 8.5 cm).

2.10.4.3. Vorbehandlung der zu analysierenden Proteinproben

20 µl Probenpuffer (3.), 20 µl 20%iges SDS, 40 µl 50%iges Glycerin und 2 µl ß-Mercaptoäthanol wurden in verschließbare Reagiergefäße ('Eppendorf-Hütchen') gegeben und mit der Proteinlösung (und ggf. noch mit H_2O-bidest) auf 200 µl aufgefüllt. Bei stark verdünnten Proteinsuspensionen können auch 300 µl Gesamtvolumen elektrophoretisiert werden. Die Volumina der einzelnen Substanzen (s.o.) sind dann entsprechend zu vergrößern, um ihre Endkonzentration (0.05 M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% Glycerin und 1% Mercaptoäthanol) im Inkubationsansatz konstant zu halten. Die Gefäße wurden verschlossen und 12-16 h lang bei 45°C gehalten. Danach wurden die einzelnen Proben mit jeweils 10µl einer 0.1%igen Bromphenolblau-Lösung versetzt und auf die fertigen Röhrchengele aufgetragen.

2.10.4.4. Durchführung der Elektrophorese

Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 2 mA/Röhrchen.
Da die FAS-Untereinheiten generell Molekulargewichte um 2-2.5 x 10^5 Dalton aufweisen, wurde die Elektrophorese erst eine halbe Stunde, nachdem die Bromphenolblau-Bande das untere Ende des Gels verlassen hatte, abgeschaltet. Die einzelnen Röhrchengele wurden aus den Glastuben entfernt, in Reagenzgläser überführt und nach 2.10.1.3. gefärbt (Mindestdauer 12 h) und entfärbt. Die Aufbewahrung der Gele erfolgte bis zur photographischen Dokumentation in 7%iger Essigsäure.

2.11. MARKIERUNG VON HEFE- UND C.COHNII-FAS DURCH RADIOAKTIVE SUBSTRATE UND INHIBITOREN

Für Versuche zur radioaktiven Markierung der Fettsäuresynthetasen aus den o.g. Organismen wurde (2-^{14}C)-Malonyl-CoA (53 mCi/mMol), (1-^{14}C)-Acetyl-CoA (52 mCi/mMol) und (1-^{14}C)-Jodacetamid (13.1 mCi/mMol) verwendet. Die Beladung der Enzyme mit radioaktivem Acetyl- und/oder Malonyl-CoA folgte der von STOOPS et al. (1975) publizierten Methode. Markierungen mit ^{14}C-Jodacetamid wurden nach der Vorschrift von KRESZE et al. (1976) durchgeführt.

Nach den entsprechenden Inkubationen wurden die ^{14}C-markierten Proteine durch Gelfiltration über Sephadex G25 oder Sephadex G50 vom nicht-gebundenen radioaktiven Material abgetrennt. Die Analyse der so behandelten Proteine erfolgte entweder durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach STOOPS et al. (1975) (s.a. 2.10.1.) oder durch Elektrophorese unter nativen Bedingungen in Polyacrylamid-Gradientengelen (s. 2.10.2.). Dazu wurden die Gelkanäle, die radioaktiv-markierte Proteine enthielten, ausgeschnitten, in 0.5 bis 0.2 cm große Stückchen zerlegt, über Nacht bei 70°C mit je 1 ml 0.2 N NaOH pro Gelscheibe behandelt, mit je 0.2 ml 2 N Essigsäure angesäuert und jeweils in 10 ml Toluol-Triton-Szintillator gezählt. Die aus den Gelscheibchen freigesetzte Radioaktivität wurde mit der Proteinanfärbung in einem Referenzkanal verglichen, der die gleiche Probe ohne radioaktiven Zusatz enthielt.

Bei verdünnten Enzymsuspensionen der beiden Fettsäuresynthetasen wurde der o.a. Gelfiltrationsschritt weggelassen und die markierten Proteine direkt der gelelektrophoretischen Analyse unterzogen.

2.12. ANALYTISCHE SACCHAROSE-DICHTEGRADIENTEN-ZENTRIFUGATION

Zur Bestimmung des Molekulargewichts der gereinigten C.cohnii-FAS durch Zentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten wurde nach der Methode von MARTIN & AMES (1961) verfahren.

Benutzt wurden Gradienten von 5 - 30% Saccharose (w/w, in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.6, 2 mM DTE, 2 mM EDTA-Na_2) mit einem Volumen von 11 ml. Die FAS-Proben wurden, sofern glycerin- oder salzhaltig, vor dem Auftrag gegen den verwendeten Gradientenpuffer dialysiert. Gleiches gilt für die zugesetzten Eichproteine (ß-Galactosidase, Ferritin, Catalase, Fumarase und LDH). Die Zentrifugationsdauer betrug 15 h bei 4-8°C und 20000 UpM (Rotor SW 41, s. 2.4.1.). Nach Beendigung der Zentrifugation wurden die Becherinhalte in ca. 400-µl-Portionen aufgefangen und die Dichte der einzelnen Fraktionen mit einem Refraktometer bestimmt. Die Enzymaktivitäten der zugesetzten Eichproteine wurden nach 2.7.1. - 2.7.4. bestimmt. Ferritin wurde anhand der roten Färbung identifiziert und der Ferritingehalt der einzelnen Fraktionen durch Bestimmung der Absorption bei 280 und 260 nm festgestellt. Mit Hilfe des radioaktiven Einbautests nach 2.7.8.1. wurden die Fraktionen auf Vorhandensein von C.cohnii-FAS-Aktivität hin untersucht.

2.13. ZÜCHTUNG DER DINOFLAGELLATEN

Die Vermehrung von C.cohnii-Zellen auf Agarplatten (als Stammkultur zur Aufbewahrung des Organismus) bzw. in Flüssigkultur erfolgte in einem definierten synthetischen Komplett-Medium (MLH-Medium) nach den bei TUTTLE & LOEBLICH (1975) gefundenen Angaben. Hierbei handelt es sich um eine verbesserte Version des zuerst von PROVASOLI & GOLD (1962) beschriebenen vollsynthetischen AXM-Mediums.

2.13.1. ZÜCHTUNG VON C.COHNII IN MLH-FLÜSSIGKULTUREN

2.13.1.1. Lösungen

Das für die Vermehrung der Dinoflagellaten verwendete Kulturmedium (MLH-Medium) setzte sich aus nachfolgend aufgelisteten Komponenten zusammen:

NaCl.....	19.99	g/l	(342 mM)
KCl.....	0.67	g/l	(9 mM)
$CaCl_2 \times 2H_2O$.....	1.103	g/l	(7.5 mM)
$MgSO_4 \times 7H_2O$.....	6.9	g/l	(28 mM)
$(NH_4)_2SO_4$.....	0.198	g/l	(1.5 mM)
Na_2-Glycerophosphat x $5H_2O$.....	0.242	g/l	(0.79 mM)
Na-Acetat x $3H_2O$.....	2.04	g/l	(15 mM)
Betain-Hydrochlorid.....	1.49	g/l	(9.7 mM)
L-Histidin.....	0.124	g/l	(0.8 mM)
D(+)-Glucose-Monohydrat.....	4.36	g/l	(22 mM)
MES-Puffersubstanz.....	1.56	g/l	(8 mM)
Vitamin-Stammlösung (10000fach)...	0.1	ml/l	
Metall-Stammlösung ('F-metals', 100fach).....	10	ml/l	

Der pH-Wert des fertig gemischten Mediums muß vor dem Autoklavieren mit 10 N NaOH auf 6.6 eingestellt werden (= für das Wachstum optimaler pH-Wert).

- Vitamin-Stammlösung (10000x konz.):

  2 mg D(+)-Biotin (Vitamin H), 1 g Thiamin·HCl (Vitamin B_1-Hydrochlorid) und 1 mg Cobalamin (Vitamin B_{12}) wurden in 100 ml H_2O-bidest gelöst. Die fertige Lösung wurde durch Sterilfiltration keimfrei gemacht. Von der Vitaminstammlösung wurden jedem Liter Kulturmedium 0.1 ml zugegeben, so daß die Endkonzentration der Vitamine im Medium die folgende war: 8.2×10^{-9}M Biotin, 2.96×10^{-6}M Thiamin und 7.49×10^{-10}M Cobalamin.

- Metall-Stammlösung ('F-metal-mix', 100x konz.):

NTA (Nitrilotriessigsäure, = Titriplex I, E.MERCK).....	1.147	g/l (6 mM)
5-Sulfosalicylsäure x $2H_2O$	20.34	mg/l (0.08 mM)
$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ x $6H_2O$	70.585	mg/l (0.18 mM)
$CoSO_4$ x $7H_2O$	475.06	mg/l (1.69 mM)
Na_2MoO_4 x $2H_2O$	251.63	mg/l (1.04 mM)
$ZnSO_4$ x $7H_2O$	43.13	mg/l (0.15 mM)
NaOH (zum Lösen von NTA)	1.2	g/l (30 mM)

Die oben aufgeführten Substanzen wurden in 900 ml H_2O-bidest gelöst, mit HCl-konz. auf pH 3.8 gebracht und auf 1 l aufgefüllt. Jedem Liter MLH-Medium wurden 10 ml der Metallstammlösung zugesetzt.

2.13.1.2. Züchtungsbedingungen

Die Kultivierung der Dinoflagellaten erfolgte im Dunkeln bei Raumtemperatur (22°C) in geschlossenen Laborschränken. Um ein optimales Wachstum der Zellen zu gewährleisten, wurde mechanisches Schütteln der Kulturen, wie von der Züchtung von Bakterien und anderer eukaryotischer Mikroorganismen her bekannt, vermieden (s.a. TUTTLE & LOEBLICH, 1975). Eine ausreichende Sauerstoffzufuhr wurde erzielt, indem die Dinoflagellaten bei einem großen Oberfläche/Volumen-Verhältnis der Kulturen gezogen wurden. So wurden 1-l-Erlenmeyerkolben mit nur 200-250 ml Medium beschickt, 20-l-Pyrexflaschen mit maximal 4-5 l Medium.

Während des Wachstums wurde die Zunahme der Zelldichte durch wiederholtes Messen der Absorption bei 590 nm verfolgt. Die hier erhaltenen Werte können mit den durch Ausplatten von Verdünnungsreihen bestimmten reellen Zellzahlen/ml korreliert werden. Die Zellen wurden bis zur spätlogarithmischen Phase wachsen lassen (OD_{590} = 0.6 - 0.8) und sodann durch niedertourige Zentrifugation geerntet. Die sedimentierten Dinoflagellaten wurden

in Waschpuffer (0.1 M $K\text{-}PO_4$-Puffer, pH 7.0, 0.25 M Saccharose und 3 mM EDTA-Na_2) resuspendiert (10 ml Puffer/g Zellmaterial), bei +4°C 20 min lang vorsichtig gerührt und erneut zentrifugiert. Das Zellsediment wurde ein zweites Mal in Waschpuffer aufgenommen und wie zuvor behandelt. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Dinoflagellaten als 'packed cells' bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Die Zellausbeute betrug bis zu 2.2 g (Feuchtgewicht) pro Liter Kulturflüssigkeit.

2.13.2. ZÜCHTUNG VON C.COHNII AUF MLH-AGARPLATTEN

MLH-Medium zum Anlegen von Stammplatten für Dauerkulturen wurde hergestellt wie unter 2.13.1.1. beschrieben, mit dem Unterschied, daß dem Kulturmedium 1.5% Agar Agar zugesetzt wurde. Der nach dem Autoklavieren flüssige MLH-Agar wurde in einem temperierten Wasserbad auf 55°C heruntergekühlt, in sterile Plastik-Petrischalen gegossen (ca. 20 ml Flüssigagar/Platte) und bei Raumtemperatur erstarren lassen. Die fertigen Agarplatten wurden bis zum Gebrauch bei +4°C aufbewahrt. Nach dem Beimpfen mit Dinoflagellaten wurden sie bei 22°C im Dunkeln bebrütet. Die Überimpfung dieser Dauerkulturen auf frische Agarplatten wurde alle 3 bis 4 Wochen wiederholt.

2.14. ZELLAUFSCHLUSSMETHODEN

2.14.1. ZELLAUFSCHLUSS DURCH ULTRASCHALLBEHANDLUNG

Kleinere Mengen an Zellmaterial (bis zu 3 g Feuchtgewicht) wurden in einem geringen Volumen Aufschlußpuffer (s. 2.14.2.1.) in in Eis/NaCl-Mischung befindlichen dickwandigen Glasröhrchen 4 x 15 sec lang mit 4 KH beschallt. Zwischen den einzelnen Beschallungsperioden wurde zum Abkühlen eine jeweils einminütige Pause eingelegt. Benutzt wurde ein BRANSON SONIC POWER Sonifier der Fa. BRANSON INSTRUMENTS, Inc., Danbury/ Connecticut (USA).

2.14.2. ZELLAUFSCHLUSS DURCH ZERMAHLEN IN DER DYNO-MILL

Der routinemäßige Aufschluß größerer Mengen Zellmaterials (zwischen 30 und 120 g Feuchtgewicht) erfolgte durch Zermahlen der Zellen mit bleifreien Glasperlen (0.25 - 0.5 mm ø für Hefe-Zellen, 0.5 - 0.75 mm ø für C.cohnii-Zellen) in der DYNO-MILL, Typ KDL (Fa. W.A. BACHOFEN, Basel/Schweiz).
Während des Mahlvorgangs wurden Mahlbehälter und Rührwerk mit fließendem kalten Wasser gekühlt.

2.14.2.1. Aufschlußpuffer

- Puffer für den Aufschluß von Hefe-Zellen:

  0.1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0, 1 mM DTE, 3 mM EDTA-Na_2, 0.25 M Saccharose. Hiervon wurden jeweils 3 ml pro Gramm Feuchtgewicht zugesetzt.

- Puffer für den Aufschluß von C.cohnii-Zellen:

  A) 0.1 M K-PO_4-Puffer, pH 7.0, 1 mM DTE, 3 mM EDTA-Na_2, 0.25 M Saccharose.

  B) 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7.6, 1 mM DTE, 3 mM EDTA-Na_2, 0.25 M Saccharose.

  Von den beiden Aufschlußpuffern (A oder B) wurden jeweils 3 ml pro Gramm Feuchtgewicht zugesetzt.

  Die unter 2.14.2.1. aufgelisteten Lösungen wurden nach Bedarf mit den Proteasehemmstoffen Benzamidin (Endkonzentration 2 mM) und/oder PMSF (Endkonzentration 1 mM) versetzt (s. dazu 3.5. und 3.6.).

2.14.2.2. Zellaufschluß

Der doppelwandige Mahlbehälter (Fassungsvermögen 300 ml, kühlbar durch Wasserdurchstrom zwischen innerer und äußerer Glaswandung) wurde nach den Angaben des Herstellers an die DYNO-MILL angeschlossen und mit 240 ml bleifreien Glasperlen gefüllt (s. 2.14.2.). Die Wasserkühlung wurde angestellt und das Ganze vor Zugabe der aufzuschließenden Zellsuspension mindestens 30 min lang vorgekühlt.

Anschließend wurde die die Glasperlen als Mahlkörper beinhaltende Aufschlußkammer mit den in einem der o.a. Puffer resuspendierten Zellen (s.2.14.2.1.) beschickt und verschlossen. Der Zellaufschluß erfolgte durch dreimaliges Zermahlen bei einer Rührscheibengeschwindigkeit von 3000 UpM (jeweils 1.5 min lang). Um ein Warmwerden der Suspension zu verhindern, wurde zwischen den einzelnen Mahlvorgängen eine jeweils zweiminütige Pause eingelegt. Das auf diese Weise gewonnene Zellhomogenat wurde zusammen mit den Glasperlen in ein vorgekühltes Becherglas abgelassen. Nachdem sich die Perlen am Boden des Gefäßes abgesetzt hatten, wurde der Überstand in einen im Eis stehenden Zentrifugenbecher überführt. Die Glasperlen wurden zweimal mit je 50 ml des verwendeten Aufschlußpuffers unter vorsichtigem Rühren mit einem Glasstab gewaschen, absinken lassen und die Überstände mit dem Rohextrakt vereinigt. Anschließend wurde das Zellhomogenat durch differentielle Zentrifugation fraktioniert (s.2.15. bzw. 2.16.).

2.15. ZELLFRAKTIONIERUNG DURCH DIFFERENTIELLE ZENTRIFUGATION

Alle Zentrifugationsschritte wurden bei +4°C in der SORVALL RC2-B durchgeführt (benutzte Rotoren: SS-34 und GSA). Der aus 2.14.2.2. gewonnene Rohextrakt wurde nach unten beschriebenem Schema fraktioniert:

1. Das Rohhomogenat wurde für 5 min bei 1000 x g zentrifugiert (Sediment: Zellkerne und Membranfragmente sowie unzerstörte Zellen = ca. 1% der in die DYNO-MILL eingebrachten Zellmenge);
2. der entstandene Überstand wurde zur Fettentfernung durch Glaswolle oder mehrere Lagen Verbandsmull filtriert (gleiches gilt für die nachfolgenden Überstände) und einer zweiten fünfminütigen 1000xg-Zentrifugation unterworfen;
3. der zweite 1000xg-Überstand wurde nach erfolgter Fettentfernung (s.o.) 15 min lang bei 10000 x g zentrifugiert (Sediment: Mitochondrienfraktion);

4. der erhaltene Überstand wurde wie oben filtriert und für 20 min bei 24000 x g zentrifugiert (Sediment: Lysosomenfraktion sowie leichtere Mitochondrien und schwere mikrosomale Partikel);

5. der noch trübe 24000xg-Überstand wurde 60-90 min lang bei 100000 x g klarzentrifugiert (Sediment: Mikrosomenfraktion). Der partikelfreie 100000xg-Überstand enthielt die löslichen cytoplasmatischen Proteine, u.a. auch die FAS-Enzymkomplexe. Falls der erhaltene Überstand noch eine deutliche Trübung aufwies, wurde er einer zweiten 100000xg-Zentrifugation unterzogen.

2.16. HERSTELLEN EINES 100000xg-ÜBERSTANDS ALS AUSGANGSMATERIAL FÜR DIE ISOLIERUNG DER FETTSÄURESYNTHETASEN

Die einzelnen Zentrifugationsschritte erfolgten wie in 2.15. bei +4°C. Für die Gewinnung von 100000xg-Überständen aus nach 2.14.2.2. erhaltenen Rohextrakten, die als Ausgangsbasis für die Reinigung der S.cerevisiae- bzw. der C.cohnii-FAS dienten, wurde ein verkürztes Verfahren differentieller Zentrifugation angewendet:

1. Zentrifugation des Rohhomogenats für 10 min bei 2000 x g;

2. Zentrifugation des 2000xg-Überstands für 15 min bei 12000 x g;

3. Zentrifugation dieses Überstands für 60 min bei 100000 x g.

Die erhaltenen Überstände wurden vor dem jeweils nächsten Zentrifugationsschritt zur Entfernung flottierenden Fettes durch Glaswolle oder mehrere Lagen Mull filtriert (s.a. 2.15.).

2.17. AMMONIUMSULFATFÄLLUNGEN

Proteinkonzentrierungen und -fraktionierungen wurden bei 0°C oder +4°C mit flüssiger, 3.8 M Ammoniumsulfatlösung nach der Vorschrift von WOOD (1976) durchgeführt.

2.17.1. AMMONIUMSULFAT-STAMMLÖSUNGEN

A) 3.8 M $(NH_4)_2SO_4$ in 0.1 M $K\text{-}PO_4$, pH 7.0, 3 mM EDTA-Na_2;

B) 3.8 M $(NH_4)_2SO_4$ in 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 3 mM EDTA-Na_2.

Die Lösungen wurden hergestellt durch Zugabe von 682 g Ammonsulfat zu 1 l der o.g. Puffer bei 0-4°C. Notwendig werdende pH-Korrekturen wurden durch Hinzufügen von konzentrierter Ammoniaklösung vorgenommen.

2.17.2. PROTEINFÄLLUNG

Konzentrierung und Fraktionierung von Proteinsuspensionen erfolgte durch langsames Zutropfenlassen der erforderlichen Menge an Ammoniumsulfat-Stammlösung (A oder B) aus einem Scheidetrichter unter gleichzeitigem vorsichtigen Rühren der Suspension in der Kälte. Es wurde 30 min lang gefällt und anschließend weitere 30 min bei 27500 x g zentrifugiert. Die Proteinpräzipitate wurden in einem kleinen Volumen an Puffer resuspendiert und gegebenenfalls gegen die 100-200fache Menge desselben Puffers für mindestens 2 x 2 h bei +4°C dialysiert.

2.18. SÄULENCHROMATOGRAPHIEN

Die chromatographische Auftrennung von Proteingemischen bei der Reinigung der Fettsäuresynthetasen aus S.cerevisiae bzw. C.cohnii wurde, wenn nicht anders vermerkt, in der Kälte (+4°C) durchgeführt. Um konstante Durchflußraten zu erzielen, wurden peristaltische Pumpen mit auswechselbarem Getriebe der Fa. LKB Produkter, Bromma/Schweden, verwendet. Während des Trennvorgangs wurde die Proteinabsorption bei 280 nm durch ein mit einem Schreiber gekoppeltes Durchflußphotometer (s.2.6.) kontinuierlich verfolgt. Fraktioniert wurde mit einem LKB-Fraktionssammler. Die Proteinbestimmung einzelner Säulenfraktionen erfolgte nach der unter 2.6. beschriebenen Methode von WARBURG & CHRISTIAN (1941) bzw. LAYNE (1957).

2.18.1. CHROMATOGRAPHIE AN DEAE-CELLULOSE

Als Gelmaterial diente DE 52 ('preswollen', WHATMAN Ltd., Maidstone, Kent/England). Der Anionenaustauscher wurde in Pulverform geliefert.

2.18.1.1. Säulenpuffer

Zum Voräquilibrieren des Gels sowie zum Spülen bzw. Eluieren der Säulen wurden folgende Pufferlösungen verwendet:

A) 50 mM K-PO_4, pH 7.0, 1 mM DTE, 1 mM EDTA-Na_2;

B) 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM DTE, 1 mM EDTA-Na_2;

C) 0.25 M K-PO_4, pH 7.0, 1 mM DTE, 1 mM EDTA-Na_2;

D) 0.5 M K-PO_4, pH 7.0, 1 mM DTE, 1 mM EDTA-Na_2;

E) 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM DTE, 1 mM EDTA-Na_2 mit 0.5 M KCl.

F) wie E), aber mit 2 M KCl.

Der Einfluß von Variationen dieser Puffer in Bezug auf pH, Salz-, DTE- und EDTA-Konzentration auf die Reinigung der C.cohnii-FAS wird in 3.6. eingehend besprochen.

2.18.1.2. Gelvorbehandlung

Das vorgequollene DE-52-Pulver wurde in Puffer A oder B (s.o.) aufgenommen (20 ml Puffer/g DE-52) und bei Raumtemperatur 2 h lang gerührt. Anschließend wurde die Gelsuspension bei +4°C so lange mit dem verwendeten Säulenpuffer gewaschen, bis der pH-Wert der Suspension demjenigen des Puffers entsprach. Danach wurde wurde die Gelsuspension in den vorgekühlten Säulenkörper überführt (s. 2.18.1.3.), das Material absitzen lassen und vor dem Auftrag der Proteinlösung mit dem 4-6fachen Säulenvolumen gespült.

2.18.1.3. Chromatographieprozedur

Die benutzten Säulenkörper hatten Innendurchmesser von 5 cm oder 2.2 cm. Die erstgenannten Säulen mit großem

Füllvolumen dienten der Auftrennung von Proteingemischen mit mehr als 1000 mg Gesamtprotein, die kleiner dimensionierten Säulen der Auftrennung von Suspensionen mit niedrigerem Proteingehalt. Die durch die Verwendung einer LKB-Perpex-Pumpe gewährleisteten konstanten Fließgeschwindigkeiten betrugen 54 oder 102 ml/h bei beiden Säulentypen.

Nach dem Aufpumpen der Proteinlösung wurde so lange mit dem verwendeten Säulenpuffer (A oder B aus 2.18.1.1.) gespült, bis die Proteinabsorption bei 280 nm unter 0.2 abgesunken war. Die Elution von an die Gelmatrix gebundenen Proteinen erfolgte entweder durch Waschen mit Puffern höherer Leitfähigkeit (Puffer C oder E aus 2.18.1.1.) oder durch Anlegen eines linearen Gradienten mit aufsteigender Ionenstärke. Die Gradienten für große Säulen (5 cm ø) bestanden aus 200 - 300 ml Puffer A + 200 - 300 ml Puffer D bzw. aus den gleichen Mengen an Puffer B + Puffer F, die bei kleinen Säulen (2.2 cm ø) benutzten Gradienten aus jeweils 2 x 150 ml der zuvor genannten Pufferkombinationen (Pufferkomposition: s. 2.18.1.1.).

Die erhaltenen Säulenfraktionen wurden auf Vorhandensein von FAS-Aktivität (Tests nach 2.7.7.2. und 2.7.8.1.) und Proteaseaktivität (s. 2.7.6.) überprüft. Die die FAS enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und entweder durch Ammoniumsulfatfällung oder durch Ultrafiltration konzentriert (s. 2.17. bzw. 2.4.7.).

2.18.2. CHROMATOGRAPHIE AN DEAE-SEPHADEX

Als alternativer Anionenaustauscher wurde DEAE-Sephadex-A25 benutzt (Kapazität: 3.5 ± 0.5 meq/g; Partikelgröße: 40 - 120 µ). Die verwendeten Puffer und Säulenkörper sowie die Durchführung der Chromatographieprozedur entsprachen den in 2.18.1. gemachten Angaben. Die Gelvorbehandlung unterschied sich von dem in 2.18.1.2. beschriebenen Vorgang dadurch, daß das pulverförmige Gelmaterial lt. Angaben der Herstellerfirma (PHARMACIA FINE CHEMICALS, Uppsala/Schweden) vor der eigentlichen Äquilibrierung mit Säulenpuffer vorgequollen werden mußte.

Der Quellungsvorgang wurde bewerkstelligt durch Aufnahme des Gelmaterials in der 10fachen Menge an Puffer A oder B aus 2.18.1.1. Danach wurde die Suspension entweder 2 Tage lang bei Raumtemperatur stehengelassen oder aber für 3 h in ein kochendes Wasserbad gestellt. Die anschließende Äquilibrierung mit Säulenpuffer erfolgte nach 2.18.1.2. in der Kälte.

2.18.3. CHROMATOGRAPHIE AN HYDROXYLAPATIT

Als Gelmaterial diente käuflich erwerbbares BIO-Gel HTP, das von der Fa. BIO·RAD, München, geliefert wurde.

2.18.3.1. Säulenpuffer

- Laufpuffer (zum Voräquilibrieren und Spülen):

  20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM DTE, 1 mM EDTA-Na_2;

- Elutionspuffer:

  0.5 M K-PO_4-Puffer, pH 7.6, 1 mM DTE, 1 mM EDTA-Na_2.

2.18.3.2. Gelvorbehandlung

Das pulverförmige Hydroxylapatit wurde in Laufpuffer aufgenommen (20 ml/g) und bei +4°C durch vorsichtiges Rühren suspendiert. Nach 20 min wurde der Rührvorgang unterbrochen, das Gel absitzen lassen, der überstehende Puffer dekantiert und das Hydroxylapatit erneut in derselben Menge Puffer aufgenommen. Der oben beschriebene Vorgang wurde 4-5mal wiederholt. Nach Angleichung des pH-Werts der Suspension an den des Puffers wurde das Gel in eine kleine Säule gefüllt (2.2 cm Innendurchmesser), absinken lassen und mit 100 bis 200 ml Säulenpuffer gespült. Die Durchflußrate betrug 32 ml/h.

2.18.3.3. Chromatographieprozedur

Die zu fraktionierende Proteinsuspension wurde auf die wie zuvor beschrieben behandelte Hydroxylapatit-Säule aufgepumpt. Es wurde so lange mit Laufpuffer nachgewaschen, bis die Proteinabsorption bei 280 nm unter

0.05 abgesunken war. Ein linearer Gradient, bestehend aus 150 ml Laufpuffer und 150 ml Elutionspuffer (s. 2.18.3.1.), wurde angelegt und das ans Gelmaterial gebundene Protein mit aufsteigender Ionenstärke eluiert. Fraktioniert wurde mit Hilfe eines LKB-Fraktionssammlers. Die erhaltenen Säulenfraktionen wurden nach 2.7.8.1. auf FAS-Aktivität und nach 2.7.6. auf Proteaseaktivität hin durchgemessen. Die die Fettsäuresynthetase beinhaltenden Fraktionen wurden vereinigt und durch Ammoniumsulfatfällung bzw. Ultrafiltration konzentriert.

2.18.4. AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE VON PROTEASEN AN CASEIN-SEPHAROSE 4B

Die Abtrennung von proteolytischer Aktivität aus FAS-Fraktionen von C.cohnii erfolgte in Anlehnung an die von SPERLING et al. (1979) beschriebene Methode. Das an Sepharose 4B gekoppelte Casein erhielten wir dankenswerterweise von J.E. SPERLING, Ruhr-Universität Bochum.

Zur Abtrennung der Proteaseaktivität wurden die Enzymfraktionen bei +4°C über eine kleine Casein-Sepharose-Säule geschickt (1 cm Innendurchmesser, Füllhöhe 5 cm). Als Laufpuffer diente 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, mit 1 mM DTE. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 27.5 ml/h. Nach dem Probenauftrag wurde so lange mit o.g. Puffer gewaschen, bis kein Protein mehr aus der Säule austrat. Danach wurde mit dem gleichen Puffer, der aber zusätzlich 2.5 M KCl enthielt, eluiert. Durchlauf und Eluat der Säule wurden nach 2.7.6. und 2.7.8.1. auf Vorhandensein von Protease- bzw. FAS-Aktivität untersucht.

2.19. GELFILTRATIONEN

Als Material für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Gelfiltrationen zur Reinigung der S.cerevisiae- bzw. der C.cohnii-FAS wurde Sephadex G100, Sepharose 4B und Sepharose 6B bzw. -CL-6B benutzt. Die genannten Gele wurden von der Firma PHARMACIA FINE CHEMICALS, Uppsala/Schweden, bezogen. Verwendet wurden Säulenkörper mit 1 cm und 2.5 cm Innendurchmesser. Die Auf-

trennung der Proteingemische erfolgte in der Kälte bei +4°C, wobei die Absorption bei 280 nm kontinuierlich registriert wurde. Fraktioniert wurde mit einem LKB-Fraktionssammler. Der Proteingehalt der einzelnen Säulenfraktionen wurde nach der von LAYNE (1957) modifizierten Methode von WARBURG & CHRISTIAN (1941) bestimmt (s. 2.6.). Die Messung der Hefe-FAS-Aktivität erfolgte nach 2.7.7.2., die der C.cohnii-FAS nach 2.7.8.1. Proteolytische Aktivität wurde mit Hilfe des Casein-Agar-Diffusionstests nach 2.7.6. festgestellt.

2.19.1. GELFILTRATION MIT SEPHADEX G100

Die benutzte Säule (1 cm ø) wurde 40 cm hoch mit nach den Angaben des Herstellers vorgequollenem Sephadex G100 gefüllt. Als Säulenpuffer diente 0.1 M $K\text{-}PO_4$, pH 7.0, 1 mM DTE, 1 mM $EDTA\text{-}Na_2$. Vor dem Auftrag der Proteinlösung wurde mit dem vierfachen Säulenvolumen an Puffer gespült. Die Fließgeschwindigkeit während des Spülvorgangs und der anschließenden Gelfiltration des Proteingemisches betrug 16 ml/h.

2.19.2. GELFILTRATION MIT SEPHAROSE 4B

Das als Suspension unter Azid gehaltene Gelmaterial wurde nach den Angaben der Lieferfirma in eine Säule gefüllt (2.5 cm Innendurchmesser, 90 - 100 cm Füllhöhe), absitzen lassen und vor dem Gebrauch mit dem 4-5fachen Volumen an Säulenpuffer gewaschen (Durchflußrate: 27.5 ml/h; Säulenpuffer: 0.1 M Kaliumphosphat, pH 7.0, 1 mM DTE, 1 mM $EDTA\text{-}Na_2$ oder 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM DTE, 1 mM $EDTA\text{-}Na_2$, mit und ohne 0.1 M KCl). Vorgenommene Variationen der o.g. Puffer werden in Kapitel 3 ("ERGEBNISSE") bei der Beschreibung der entsprechenden Versuche abgehandelt.

2.19.3. GELFILTRATION MIT SEPHAROSE 6B UND SEPHAROSE CL-6B

Benutzt wurden Säulenkörper mit 1 cm oder 2.5 cm Innendurchmesser, die mit dem als Azid-haltige Suspension gelieferten Gelmaterial zwischen 50 und 95 cm hoch ge-

füllt wurden (Einzelheiten s. Kapitel 3 unter den betreffenden Versuchsbeschreibungen). Vor dem Auftrag der Proteinlösung wurden die Säulen zur Azidentfernung mit dem 4-5fachen Volumen an Puffer gespült. Benutzt wurden die in 2.19.2. beschriebenen Säulenpuffer. Variationen der Pufferlösungen in Bezug auf Ionenstärke, DTE- und EDTA-Gehalt sowie Zusatz von Proteasehemmstoffen werden in 3.5. - 3.7. angegeben. Die benutzten Durchflußraten betrugen 16 ml/h für Sepharose-6B-Säulen mit 1 cm Innendurchmesser und 27.5 ml/h für sämtliche Sepharose-CL-6B-säulen und Sepharose-6B-Säulen mit 2.5 cm Innendurchmesser.

Das Ausschlußvolumen (v_o) der Säulen wurde durch Gelfiltration von Blau Dextran 2000 festgelegt. Die in 2.19.2. und 2.19.3. beschriebenen Sepharose-Säulen wurden durch Gelfiltration von Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht (Hefe-FAS, Ferritin-Dimer und -Monomer, Catalase und LDH) geeicht.

Um die in 2.19. aufgeführten Gelmaterialien nach dem Gebrauch vor mikrobiellen Angriffen zu schützen, wurden die Säulen im Anschluß an die Gelfiltrationen mit dem 3-4fachen Volumen an Puffer nachgewaschen, der 0.02% Azid enthielt, und bei +4°C im Kühlraum bis zur erneuten Verwendung aufbewahrt.

3. ERGEBNISSE

3.1. WACHSTUM VON C.COHNII IN MLH-FLÜSSIGKULTUREN

Zur Ermittlung der Generationszeit der Dinoflagellaten bei der Zellvermehrung in MLH-Flüssigmedium wurde eine Wachstumskurve erstellt. Dazu wurden die Dinoflagellaten in 1 l MLH-Medium in einem 5-l-Erlenmeyerkolben bei Raumtemperatur (21 - 22°C) im Dunkeln gezüchtet (s. 2.13.). Eine Agitation der Kultur durch mechanisches Schütteln zwecks höherer Sauerstoffversorgung der Zellen wurde vermieden (TUTTLE & LOEBLICH, 1975). Als Inoculum dienten 10 ml aus einer direkt von MLH-Agarplatten (Stammplatten) angeimpften, spätlogarithmischen 25-ml-Vorkultur (ca. 1×10^7 Zellen/ml). Zu den in Abb. 3-1 angegebenen Zeitpunkten wurden der wachsenden Kultur jeweils 2 ml entnommen. Die Probe wurde, um eine Aggregation der mobilen Zellen an der Flüssigkeitsoberfläche der Meßküvette zu verhindern, mit 0.05 ml 40%igem Formaldehyd versetzt (PROVASOLI & GOLD, 1962) und die Zelldichte im Photometer bei 590 nm bestimmt.

Unter den angegebenen Züchtungsbedingungen betrug die Generationszeit während der logarithmischen Wachstumsphase zwischen 11 und 13 h. Bei Zellzüchtungen größeren Maßstabs (5 l MLH-Medium in 20-l-Pyrexflaschen) verlängerte sich die Verdopplungszeit auf durchschnittlich 14 - 15 h, und die stationäre Phase wurde nach etwa 6 Tagen erreicht. Im in Abb. 3-1 gezeigten Beispiel erreichten die Zellen bereits nach 4 - 5 Tagen die stationäre Phase bei einer Zelldichte von $1.8 - 3 \times 10^6$ Zellen/ml.

Versuche, durch erhöhte Sauerstoffversorgung der Zellen (z.B. durch mechanisches Schütteln, Rühren auf einem Magnetrührer oder Durchblasen der Kulturen mit steriler Luft) eine größere Wachstumsrate und/oder Zellausbeute zu erzielen, erbrachten kein positives Ergebnis, sondern resultierten in stark verlangsamtem Wachstum und bis zu 70% geringerer Zellausbeute. Gleiches gilt für die Züch-

tung der heterotrophen Dinoflagellaten im Licht (Laborbeleuchtung). Aus diesen Gründen wurden sämtliche Zellzüchtungen im Dunkeln und bei stehenden Kulturen durchgeführt. Eine ausreichende Sauerstoffversorgung wurde durch die Wahl eines möglichst großen Oberfläche/Volumenverhältnisses der Kulturen gewährleistet.

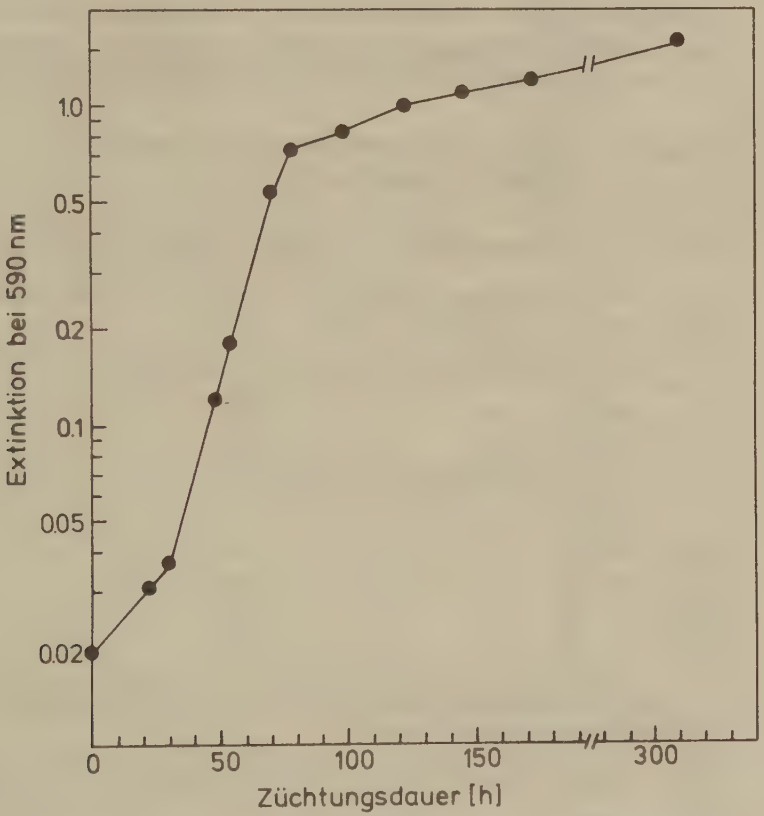


Abb. 3-1: Wuchskurve von C.cohnii bei Zellvermehrung in 1 l MLH-Medium

3.2. ANALYSE DES FETTSÄUREMUSTERS DER GESAMTLIPIDFRAKTION VON C.COHNII

Die Dinoflagellaten wurden wie zuvor beschrieben bis zur spätlogarithmischen Phase wachsen lassen und durch niedertourige Zentrifugation geerntet. Die Extraktion der

Gesamtlipide mit Chloroform/Methanol erfolgte nach 2.9.1., die Transesterifizierung sämtlicher Lipidklassen mit 2 N Natrium-Methylat nach 2.9.2. Die Analyse der so gewonnenen Fettsäuremethylester (FSME) wurde mit Hilfe der Gaschromatographie nach 2.9.3. durchgeführt. Ein typisches Gaschromatogramm zeigt Abb. 3-2.

Durch quantitative Auswertung der Massenpeakflächen ergab sich für die individuellen FSME nachstehend aufgelisteter Prozentanteil an den Gesamtfettsäuren (Tab.3-1):

Tab. 3-1: Fettsäurezusammensetzung der Gesamtlipide aus Crypthecodinium cohnii

FSME[+]	% Gesamt-FSME[++]	% Gesamt-FSME (n.HARRINGTON & HOLZ, 1968)
$C_{10:0}$-ME	2	2
$C_{12:0}$-ME	8	8
$C_{14:0}$-ME	21	19
$C_{16:0}$-ME	22	20
$C_{16:1}$-ME	1	1
$C_{18:0}$-ME	2	1
$C_{18:1}$-ME	11	14
$C_{22:6}$-ME	33	30

[+]Die Zahl vor dem Doppelpunkt gibt die Länge der Kohlenwasserstoffkette an, die Zahl danach die Anzahl der Doppelbindungen im Molekül.

[++]Die angegebenen Werte wurden wie in der Literatur (s.o.) auf ein volles Prozent auf- bzw. abgerundet.

Zusammensetzung und prozentualer Anteil der Fettsäuren aus der Gesamtlipidfraktion von C.cohnii entsprachen den von HARRINGTON & HOLZ (1968) veröffentlichten Werten bis auf geringfügige Abweichungen (s.o.). Ein negativer Einfluß der Zellzüchtung bei stehender Kultur unter Berücksichtigung eines großen Oberfläche/Volumenverhältnisses an Stelle des mechanischen Schüttelns des Mediums auf die Menge an gebildeter Docosahexaensäure ($C_{22:6}$), wie von den genannten Autoren behauptet, konnte nicht nachgewiesen werden.

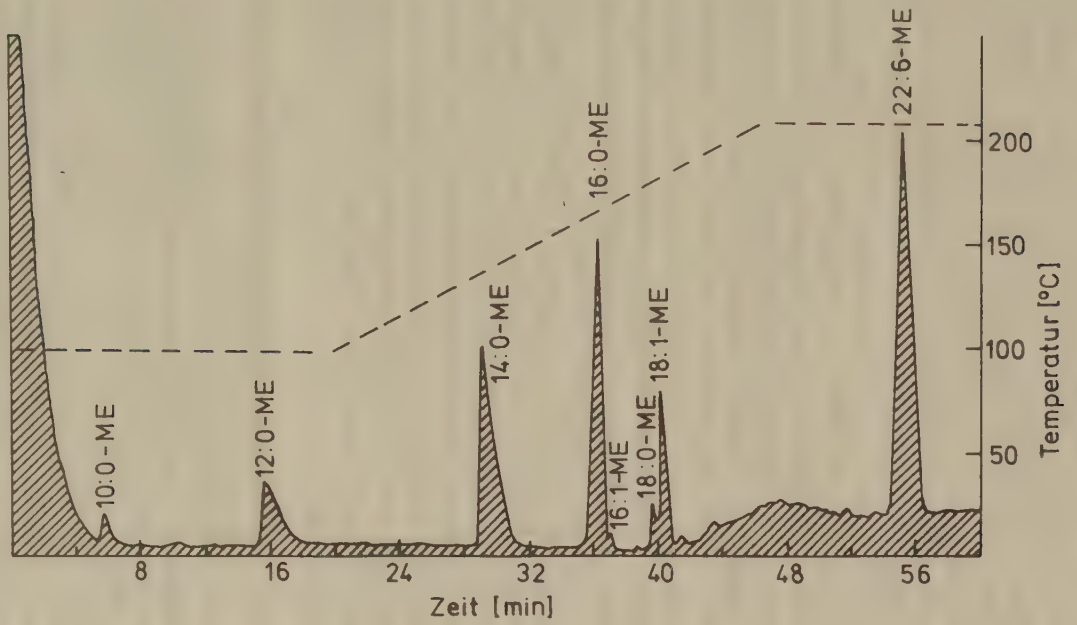


Abb. 3-2: Gaschromatographische Analyse von FSME aus der Gesamtlipid-Fraktion von C.cohnii.

Nomenklatur: z.B. 14:0-ME = Myristinsäuremethylester

3.3. LOKALISIERUNG DES MALONYL-CoA-ABHÄNGIGEN FETTSÄURE-BIOSYNTHESESYSTEMS IN C.COHNII

Die Neusynthese langkettiger, geradzahliger Fettsäuren findet im allgemeinen im Cytoplasma der Zelle statt, wobei Acetyl- und Malonyl-CoA als Substrate der Fettsäuresynthetase-Reaktion (FAS-Reaktion) fungieren. Die de novo-Biosynthesekapazität mikrosomaler Partikel stellt demgegenüber ein selten auftretendes Phänomen dar (s. DISKUSSION, Kapitel 4.).

Im folgenden wurde versucht, das Malonyl-CoA-abhängige Fettsäurebiosynthesesystem in C.cohnii durch Analyse definierter Zellfraktionen zu lokalisieren. Dazu wurden 30 g C.cohnii-Zellen (Feuchtgewicht) direkt nach Ernten von Zellen aus der spätlogarithmischen Wachstumsphase durch Zermahlen in der DYNO-MILL nach 2.14.2. aufgeschlossen. Der so gewonnene Rohextrakt wurde nach 2.15. durch differentielle Zentrifugation fraktioniert. Durch 90minütige Ultrazentrifugation bei 100000 x g wurde der postlysosomale Überstand (24000xg-Überstand) in die Mikrosomenfraktion (Sediment) und die löslichen cytoplasmatischen Enzyme (Überstand) weiter fraktioniert. Mit Hilfe des radioaktiven Einbautestes (FAS-Test) nach 2.7.8.1. wurden die erhaltenen Zellfraktionen auf die Fähigkeit hin überprüft, (2-^{14}C)-Malonyl-CoA in langkettige Fettsäuren zu inkorporieren. Das Ergebnis ist in Tab. 3-2 zusammengefaßt:

Tab. 3-2: Fettsäurebiosynthesekapazität von C.cohnii-Zellfraktionen

Zellfraktion[+]	Protein		FAS-Aktivität[++]	
	mg/ml	mg/Fraktion	pro mg	pro Fraktion
Überstand 1	16.5	1420	32	45440
Überstand 2	10.6	742	57.8	42890
Sediment 2	11.8	590	5	2950

[+]Überstand 1 = 24000xg-Überstand,
Überstand 2 =100000xg-Überstand,
Sediment 2 =100000xg-Sediment;

[++]Die unter der Rubrik "FAS-Aktivität" aufgeführten Daten repräsentieren eingebaute pMole Malonyl-CoA pro min und mg Protein bzw. pro min und Fraktion.

Wiedergefunden wurden trotz leichten Verlustes an Gesamtprotein 45840 pMol/min (= 100.9% der Ausgangsaktivität), wovon 93.6% auf den 100000xg-Überstand und 6.4% auf die Mikrosomenfraktion entfielen. Hauptverantwortlich für die de novo-Biosynthese von Fettsäuren in C.cohnii ist demnach - wie auch in anderen Eukaryonten - ein cytoplasmatisches Enzymsystem. Die in 3.6. beschriebenen Reinigungsversuche der Fettsäuresynthetase (FAS) aus C.cohnii gingen deshalb vom 100000xg-Überstand aus.

Der Versuch, ^{14}C-markiertes Acetat nach WEAIRE & KEKWICK (1975) bzw. NOTHELFER et al. (1977) als Ausgangssubstrat für die de novo-Biosynthese von Fettsäuren im 100000xg-Überstand zu verwenden, erbrachte keinen signifikanten Einbau von Radioaktivität in Pentan-extrahierbares Material.

3.4. UNTERSUCHUNGEN ZUR DE NOVO-BIOSYNTHESE VON FETTSÄUREN IM PARTIKELFREIEN 100000xg-ÜBERSTAND VON C.COHNII

Ausgehend von Acetyl-CoA als Startermolekül und (2-^{14}C)-Malonyl-CoA als Substrat für die FAS-Reaktion wurde im folgenden versucht, die Neusynthese langkettiger Fettsäuren im nach 2.15. gewonnenen 100000xg-Überstand näher zu charakterisieren. Hierbei wurde besonderer Wert auf die Analyse der als Substrate für Elongation und Desaturierung fungierenden Endprodukte der FAS-Reaktion gelegt.

3.4.1. PROTEINABHÄNGIGKEIT DER FAS-REAKTION

Die Abhängigkeit der Menge an synthetisierten Fettsäuren (Pentan-extrahierbares Material) von der dem Test zugesetzten Proteinmenge gibt Abb. 3-3 wieder. Der Test erfolgte nach 2.7.8.1.

Wie man der Abbildung entnehmen kann, steigt die Zunahme der Fettsäurebiosyntheserate linear an bis zu einer Konzentration von 0.25 mg 100000xg-Überstand-Protein pro ml Testvolumen, ersichtlich auch am Gleichbleiben der errechneten spezifischen FAS-Aktivität. Höhere Proteinkonzentrationen im Test führen zum Abknicken der Kurve und somit zu einer Reduzierung der spezifischen Aktivität (-17% bei 1 mg Protein/ml und -39% bei 2.5 mg Protein/ml).

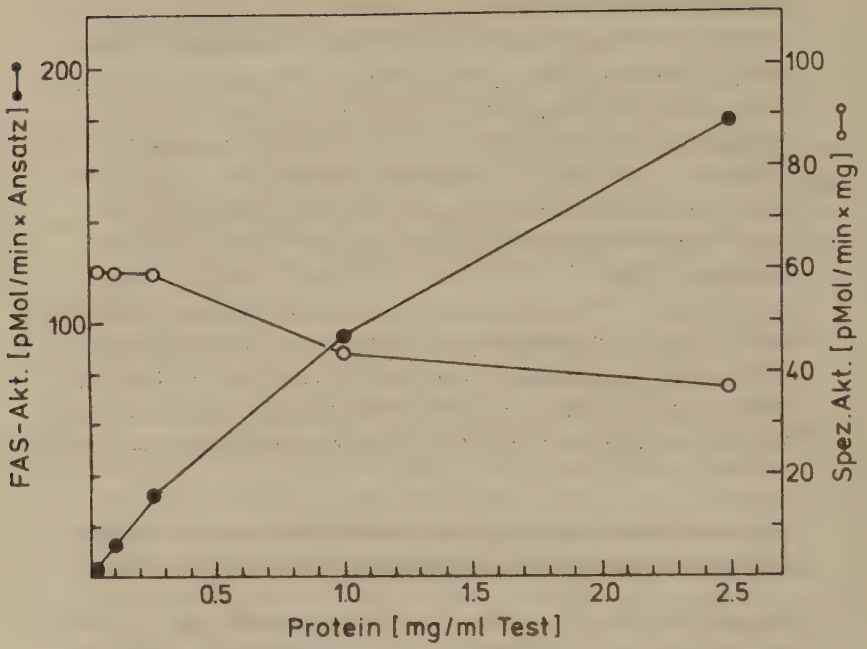


Abb. 3-3: FAS-Gesamtumsatz im 100000xg-Überstand in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration im Test

3.4.2. ZEITLINEARITÄT DES RADIOAKTIVEN ENZYMTESTS

Da es sich bei dem verwendeten (2-^{14}C)-Malonyl-CoA-Einbau-Test um enzymatische Aktivitätsbestimmungen anhand der Menge gebildeten Produkts handelt (Endproduktbestimmung, s.2.7.8.1. und 2.7.7.1.), wurde überprüft, bis zu welchem Zeitpunkt der Inkubation die Menge an neu gebildeten, radioaktiv markierten Fettsäuren linear anstieg. Gleichzeitig wurde dabei die Zeitabhängigkeit der FAS-Gesamtreaktion in aus spätlogarithmischen (5-Tage-Kultur) und aus stationären Zellen (10-Tage-Kultur) gewonnenen 100000xg-Überständen verglichen. Das Ergebnis des Versuchs ist in Abb. 3-4 graphisch dargestellt.

Die Menge an de-novo-synthetisierten Fettsäuren steigt demnach in beiden 100000xg-Überständen bis zu einer Inkubationsdauer von 45 min linear an. Bei gleicher Proteinmenge im Test (0.2 mg/ml) liegt die Einbaurate von Malonyl-Resten durch die Fettsäuresynthetase aus spätlogarithmischen Zellen um rund 40% höher als die der FAS

aus stationären Zellen (485 pMol Malonyl-CoA eingebaut/ 45 min und mg Protein zu 338 pMol/45 min x mg). Für nachfolgend beschriebene Untersuchungen zur FAS-Reaktion im 100000xg-Überstand und für Reinigungsversuche der C.cohnii-FAS (s.3.6.) wurden daher nur Zellen verwendet, die gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase geerntet worden waren.

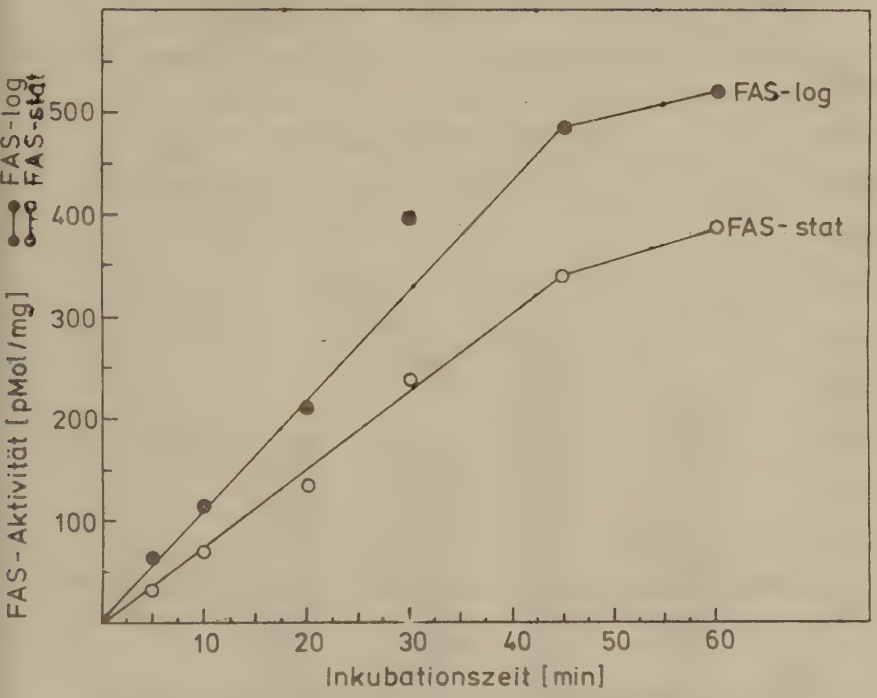


Abb. 3-4: Zeitabhängigkeit des radioaktiven FAS-Tests nach 2.7.8.1.

FAS-log = 100000xg-Überstand aus spätlogarithmischen,
FAS-stat = 100000xg-Überstand aus stationären Zellen

3.4.3. pH-OPTIMUM DER FAS-REAKTION

Die Fettsäurebiosyntheserate von nach 2.15. hergestelltem 100000xg-Überstand wurde zur Ermittlung des pH-Optimums der Reaktion im Bereich zwischen pH 6.0 und pH 9.0 bestimmt. Die Durchführung des Enzymtests erfolgte nach 2.7.8.1. Von pH 6.0 bis pH 8.0 wurde in 0.1 M K-PO_4-Puffer inkubiert, von pH 7.6 bis pH 9.0 in 0.1 M Tris-HCl-Puffer (ohne KCl-Zusatz). Die Abhängigkeit der Fettsäuresynthetase-Aktivität vom pH-Wert zeigt Abb. 3-5:

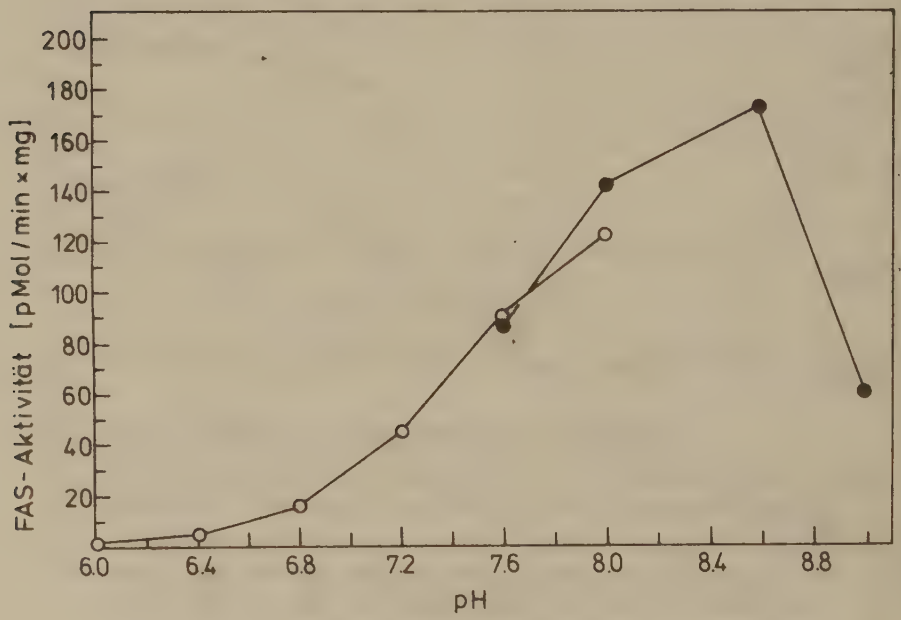


Abb. 3-5: FAS-Aktivität im 100000xg-Überstand in Abhängigkeit vom pH-Wert des Inkubationsansatzes
Inkubation in 0.1 M K-PO_4 o—o,
Inkubation in 0.1 M Tris-HCl •—• .

Das pH-Optimum für die de novo-Biosynthese langkettiger Fettsäuren im 100000xg-Überstand von C.cohnii liegt zwischen pH 8.0 und 8.6, einem für Fettsäuresynthetasen relativ alkalischen pH-Bereich (s. DISKUSSION, Kapitel 4.).

3.4.4. BEEINFLUSSUNG DER FAS-AKTIVITÄT DURCH SH-SCHUTZSUBSTANZEN

Im folgenden wurde die Auswirkung des Zusatzes verschiedener SH-Reagenzien (DTE, ß-Mercaptoäthanol und Cystein) auf die Aktivität der C.cohnii-FAS im partikelfreien 100000xg-Überstand untersucht. Der Enzymtest erfolgte nach 2.7.8.1. unter An- bzw. Abwesenheit (Ansatz 5) unterschiedlicher Konzentrationen der o.g. Substanzen. Der als Enzymquelle verwendete 100000xg-Überstand enthielt bereits 1 mM DTE, das dem Zellaufschluß-Puffer zugesetzt worden war. Da das Enzymprotein im Inkubationsansatz 1:10 verdünnt wurde, war in Test Nr. 5 (kein Zusatz von SH-Schutzmitteln) 0.1 mM DTE vorhanden. Das Versuchsergebnis ist in Abb. 3-6 wiedergegeben:

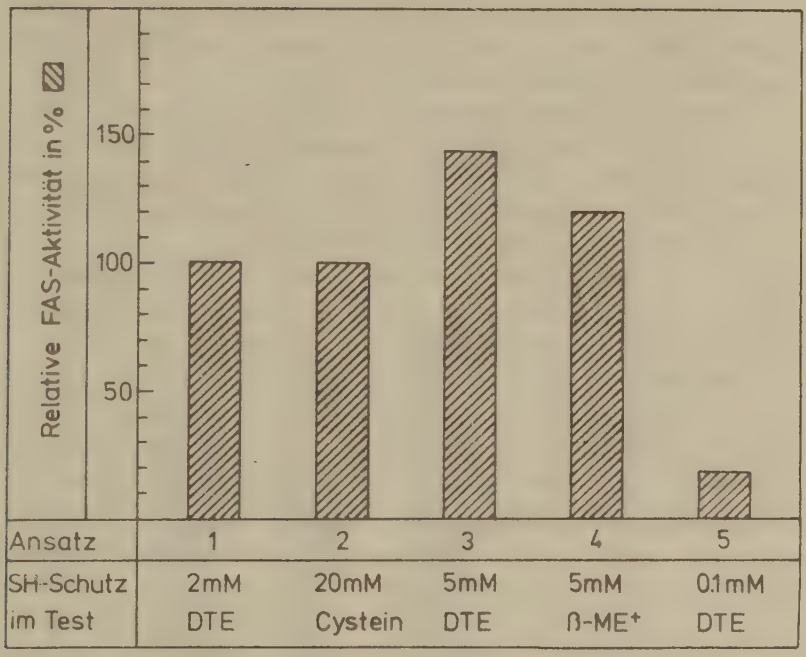


Abb. 3-6: Aktivitätssteigerung der C.cohnii-FAS durch Vorhandensein von SH-Schutzsubstanzen im Inkubationsansatz.
Die spezifische Aktivität (39.8 pMol Malonyl-CoA/min x mg) bei 2 mM DTE im Test (Ansatz 1) wurde willkürlich als 100%-Wert eingesetzt;
+ß-ME = ß-Mercaptoäthanol

Wie aus der graphischen Darstellung der erzielten Aktivitäten hervorgeht, ist das Vorhandensein von SH-Schutzreagenzien im Test für einen optimalen enzymatischen Umsatz essentiell. Bei nur 0.1 mM DTE im Inkubationsansatz (5) war die Fettsäurebiosyntheserate um mehr als 80% reduziert im Vergleich zu Ansatz 1 (2 mM DTE). Eine Erhöhung der DTE-Konzentration von 2 auf 5 mM resultierte in einer 43%igen Steigerung der FAS-Aktivität, wohingegen mit 5 mM ß-Mercaptoäthanol lediglich eine Aktivitätszunahme von 20% zu beobachten war. Von den drei hier untersuchten SH-Schutzsubstanzen zeigte DTE die beste, Cystein die schlechteste Effektivität.

3.4.5. COENZYM (NADPH, NADH) - SPEZIFITÄT DER FAS-REAKTION

Die meisten beschriebenen Fettsäuresynthetasen bevorzugen NADPH als Coenzym für beide Reduktionsschritte des Fettsäurebiosynthesezyklus. Es sind jedoch auch Systeme bekannt, bei denen nur mit einer Kombination aus NADPH und NADH maximale Fettsäuresynthesekapazität erreicht werden kann (s.DISKUSSION, Kap. 4.). Abb. 3-7 zeigt die Aktivität der C.cohnii-FAS des 100000xg-Überstands in Abhängigkeit vom gewählten Coenzym.

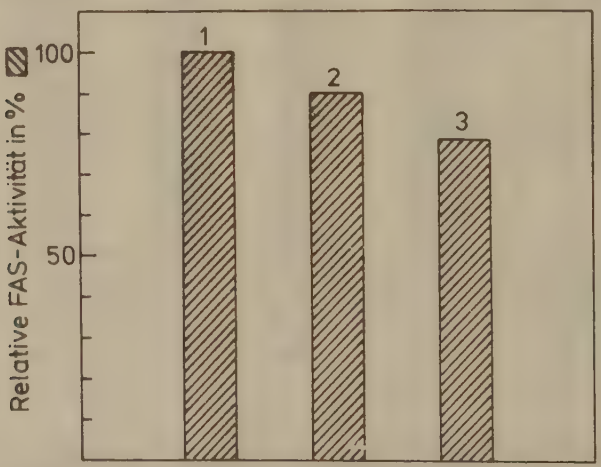


Abb.3-7: NADPH- und NADH-Abhängigkeit der C.cohnii-FAS-Aktivität im 100000xg-Überstand.
1 = jeweils 0.5 mM NADPH + NADH, 2 = 1 mM NADPH, 3 = 1 mM NADH im Test (nach 2.7.8.1.)

Wie in Abb. 3-7 gezeigt, war durch eine Kombination von NADPH und NADH die höchste FAS-Aktivität zu erzielen (1). Bei Verwendung von NADPH als alleinigem Reduktionsäquivalent war die enzymatische Aktivität um rund 10% (± 2%) reduziert (2). NADH wurde vom Enzym des 100000xg-Überstands ebenfalls akzeptiert, erbrachte jedoch nur 78% (± 5%) des durch eine Kombination beider Coenzyme erzielten enzymatischen Umsatzes (3).

3.4.6. BESTIMMUNG DER ENDPRODUKTE DER FAS-REAKTION

Die langkettigen Fettsäuren als Endprodukte der de novo-Biosynthese werden von den verschiedenen Fettsäuresynthetasen entweder in Form ihrer Acyl-CoA-Ester wie in S.cerevisiae (LYNEN, 1968) oder aber als freie Säuren wie im tierischen System (KUMAR et al., 1972) ans Cytosol abgegeben. Um zu klären, in welcher Form die Endprodukte der C.cohnii-FAS-Reaktion im 100000xg-Überstand vorliegen, wurden die in Inkubationsansätzen nach 2.7.8.1. synthetisierten freien Fettsäuren nach der Methode von BUCKNER & KOLATTUKUDY (1976) mit Chloroform oder n-Pentan extrahiert. Anschließend wurde die wässrige Phase mit methanolischer KOH verseift (2 h bei 70°C), um evtl. vorhandene Acyl-CoA-Ester zu hydrolysieren. Das Ganze wurde auf pH 2.0 angesäuert und erneut extrahiert. Der Vergleich der radioaktiven Ausbeuten zwischen 1. Extrakt (freie Fettsäuren) und 2. Extrakt (Acyl-CoA-Ester-Fraktion) ist in Tab. 3-3 wiedergegeben. Wie die Auswertung ergab, liegen die Endprodukte der FAS-Reaktion in beiden untersuchten 100000xg-Überständen zu rund 80% als freie Fettsäuren vor.

Tab. 3-3: Endprodukte der C.cohnii-FAS-Reaktion im 100000xg-Überstand

Enzym+	mg/Test	1.Extrakt (cpm)	2. Extrakt (cpm)	Verhältnis 1./2.Extrakt
FAS-log	0.4	1467	360	4 : 1
FAS-stat	0.6	1453	387	3.8 : 1

+FAS-log = 100000xg-Überstand aus spätlogarithmischen Zellen (5-Tage-Kultur); FAS-stat = 100000xg-Überstand aus stationären Zellen (10-Tage-Kultur).
Die aufgeführten cpm-Werte repräsentieren die nach 45 min Inkubation bei 22°C gebildete Gesamtmenge an neu synthetisierten Fettsäuren.

3.4.7. FETTSÄUREMUSTER DER FAS-REAKTIONSPRODUKTE

Im folgenden wurden die Endprodukte der FAS-Reaktion in C.cohnii (hauptsächlich freie Fettsäuren, s.3.4.6.) in Hinsicht auf Zusammensetzung und Kettenlänge näher untersucht. Dazu wurden die Enzymtests nach Beendigung der Reaktion mit n-Pentan extrahiert, die in der organischen Phase befindlichen ^{14}C-markierten Fettsäuren mit Diazomethan verestert (s. 2.8.2.) und die so gewonnenen Fettsäuremethylester (FSME) nach 2.8.3. mit Hilfe der Radiogaschromatographie analysiert.
Die Inkubationen wurden für die C.cohnii-FAS nach 2.7.8.1. bei Raumtemperatur (22°C) und für die S.cerevisiae-FAS nach 2.7.7.1. bei 30°C durchgeführt. Die Inkubationsdauer betrug 20 min. Die Ergebnisse sind in Tab. 3-4 zusammengefaßt. Die dazugehörigen Radiogaschromatogramme sind in schematisierter Form in Abb. 3-8, A - C wiedergegeben.

Tab. 3-4: Analyse der Kettenlänge der de novo synthetisierten Fettsäuren in C.cohnii und S.cerevisiae durch Radiogaschromatographie

Ansatz[+]	mg/Test	cpm Gesamt-FSME (100%)	Davon entfallen auf: $C_{12:0}$-ME cpm	%	$C_{14:0}$-ME cpm	%	$C_{16:0}$-ME cpm	%	$C_{18:0}$-ME cpm	%
A	0.3	469	70	15	230	49	114	24	55	12
B	0.2	1828	-	-	494	27	1133	62	201	11
C	0.3	7787	-	-	299	4	5207	67	2281	29

[+]A = 100000xg-Überstand von C.cohnii; B = durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (s.3.6.2.) und Sepharose-6B-Gelfiltration (s. 3.6.7.) angereinigte C.cohnii-FAS; C = 100000xg-Überstand von S.cerevisiae.

Primäres Endprodukt der FAS-Reaktion im 100000xg-Überstand ist bei C.cohnii die Myristinsäure ($C_{14:0}$) mit ca. 50% der wiedergefundenen Radioaktivität, gefolgt von Palmitinsäure ($C_{16:0}$) mit 24% sowie Laurin- und Stearinsäure ($C_{12:0}$ und $C_{18:0}$) mit 15 bzw. 12% (Ansatz A). Diese Radioaktivitätsverteilung änderte sich nach Anreinigung der Fettsäuresynthetase aus dem 100000xg-Überstand (Ansatz B). Hier war die Palmitinsäure primäres Reaktionsprodukt mit 62% des gesamten radioaktiven Einbaus, während der Anteil der Myristinsäure auf 27% zurückging. Der Anteil neu gebildeter Stearinsäure blieb mit 11% nahezu konstant, wohingegen die Laurinsäure keine ^{14}C-Markierung mehr aufwies.

Die hier beobachtete Verschiebung des radioaktiven Einbaus von den kürzerkettigen Fettsäuren ($C_{12:0}$ und $C_{14:0}$) hin zu solchen mit längerer Kohlenwasserstoffkette (vor allem $C_{16:0}$), ließ sich bereits durch einfache Manipulation des 100000xg-Überstands erzielen (z.B. durch Konzentrierung der Proteinsuspension mittels Ultrafiltration über AMICON-Membranen, s.u.). Derartige Veränderungen des Endproduktmusters der FAS-Reaktion

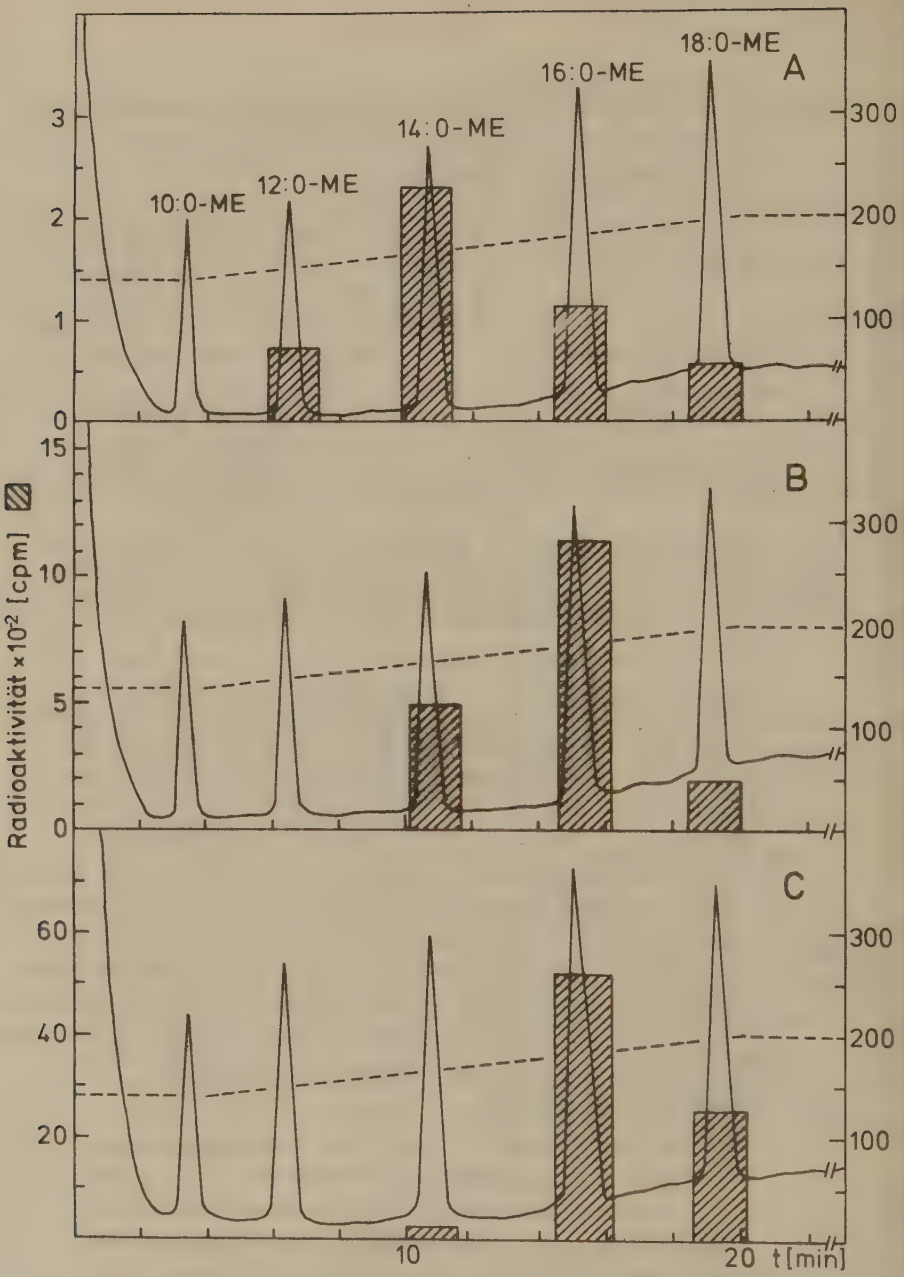


Abb. 3-8, A-C: Radiogaschromatische Analyse des Endproduktmusters der FAS-Reaktion in C.cohnii und S.cerevisia

A = Endproduktmuster im C.cohnii-100000xg-Überstand;
B = Endprodukte von über Sepharose 6B angereinigtem 100000xg-Überstand (s.a.Legende zu Tab.3-4);
C = Endprodukte der Hefe-FAS-Reaktion (100000xg-Überstand)

konnten bei der Reinigung der Fettsäuresynthetase aus Hefe, die als Vergleich herangezogen wurde, nicht beobachtet werden.

3.4.8. VERÄNDERUNG DES FETTSÄUREMUSTERS DER FAS-REAKTIONS-PRODUKTE DURCH KONZENTRIERUNG ODER ANREINIGUNG DES 100000xg-ÜBERSTANDS

Nachfolgend wurden die bereits angesprochenen Veränderungen im Muster der de novo-synthetisierten Fettsäuren, die sich auf Grund von Konzentrierung bzw. Anreinigung der C.cohnii-FAS des 100000xg-Überstands ergaben, mit Hilfe der Radiogaschromatographie genauer untersucht (s.a. 3.4.7., Tab. 3-4, Ansatz B, und Abb. 3-8,B).

Dazu wurden 35 g C.cohnii-Zellen (Feuchtgewicht) nach 2.14.2. in der DYNO-MILL aufgeschlossen und der Rohextrakt einer Zellfraktionierung durch differentielle Zentrifugation unterworfen (s. 2.15.). Der so gewonnene 100000xg-Überstand wurde zur vollständigen Entfernung evtl. noch vorhandener leichter Mikrosomenpartikel ein weiteres Mal 60 min lang bei 100000 xg ultrazentrifugiert. Dieser 'nachgereinigte' zweite 100000xg-Überstand diente als Ausgangsmaterial für die im folgenden beschriebenen Versuche:

1. Konzentrierung über AMICON XM 50,
2. Konzentrierung über AMICON XM 300,
3. Anreinigung durch Gelfiltration über Sephadex G-100,
4. Anreinigung durch zweimalige, jeweils 14stündige Ultrazentrifugation bei 100000 x g (nach LYNEN, 1969).

Die einzelnen FAS-Fraktionen wurden nach 2.7.8.1. 30 min lang bei 22°C inkubiert (jeweils 0.5 mg Protein in 2 ml Testvolumen). Die neu gebildeten, ^{14}C-markierten freien Fettsäuren wurden nach Beendigung der Reaktion mit n-Pentan ausgeschüttelt und nach 2.8.2. mit Diazomethan verestert. Die so hergestellten Fettsäuremethylester (FSME) der FAS-Reaktionsprodukte wurden nach 2.8.3. radiogaschromatographisch analysiert. Die Ergebnisse der einzelnen Versuche sind in Tab.3-5 zusammengefaßt.

Tab. 3-5: Radiogaschromatographische Analyse de novo synthetisierter Fettsäuren von durch Ultrafiltration konzentriertem oder durch Gelfiltration bzw. Ultrazentrifugation angereinigtem 100000xg-Überstand von C.cohnii

Ansatz[+]	cpm Gesamt-FSME (100%)	Davon entfallen auf :									
		$C_{12:0}$-ME		$C_{14:0}$-ME		$C_{16:0}$-ME		$C_{18:0}$-ME		$C_{20:0}$-ME		$C_{22:0}$-ME	
		cpm	%	cpm	%	cpm	%	cpm	%	cpm	%	cpm	%
1	388	52	13	210	54	72	19	54	14	-	-	-	-
2	1401	59	4	200	14	672	48	304	22	54	4	112	8
3	375	38	10	80	21	168	45	89	24	-	-	-	-
4	671	39	6	100	15	277	41	153	23	34	5	68	10
5	789	-	-	41	5	113	14	368	47	55	7	212	27

[+]Ansätze: 1 = 2. 100000xg-Überstand (Ausgangsmaterial); 2 = AMICON-XM50-Konzentrat;
3 = AMICON-XM300-Konzentrat; 4 = Sephadex-G100-Peakfraktion (Ausschlußvolumen der Säule);
5 = Sediment des 2. Ultrazentrifugationsschrittes.

Die generelle Tendenz der Verschiebung des Hauptanteils der de novo synthetisierten Fettsäuren zum längerkettigen Bereich des Fettsäurespektrums hin (nach Konzentrierung bzw. Anreinigung des 100000xg-Überstands) ist hier deutlich sichtbar. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt bei den FAS-Reaktionsprodukten vom Sediment der Ultrazentrifugation (Ansatz 5). Auffällig ist dabei das Auftauchen von radioaktiver Markierung in Fettsäuren mit einer größeren Kettenlänge als $C_{18:0}$. Signifikanter Einbau von radioaktivem Kohlenstoff in Fettsäuren mit einer geringeren Kettenlänge als Laurinsäure ($C_{12:0}$) konnte in keinem der untersuchten Inkubationsansätze nachgewiesen werden. Während bei Konzentrierung des 100000xg-Überstands durch Ultrafiltration über AMICON-XM50-Membranen (oder XM 100A) keine FAS-Aktivität im Durchlauf nachgewiesen werden konnte, waren bei Konzentration über XM300-Membranen stets 20 - 30% der wiedergefundenen Enzymaktivität im Durchlauf enthalten. Dieses Verhalten der C.cohnii-FAS tritt auch bei der XM300-Konzentrierung von gereinigtem Enzym auf (s. 3.9.1.).

3.5. REINIGUNG DER FETTSÄURESYNTHETASE AUS S.CEREVISIAE

Um ein mit der C.cohnii-FAS vergleichbares Enzym zur Verfügung zu haben, wurde die besonders durch LYNEN und Mitarbeiter gut charakterisierte Fettsäuresynthetase aus S.cerevisiae gereinigt. Die Isolierung des Hefe-Enzyms erfolgte im wesentlichen nach der für die C.cohnii-FAS unter 3.6. beschriebenen Prozedur. Das Verhalten beider Enzyme in den einzelnen Reinigungsschritten konnte so miteinander verglichen werden. Mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kombination aus DEAE-Cellulose-Chromatographie und Sepharose-6B-Gelfiltration für die Isolierung der Hefe-FAS (s.u.) wird ein neues Reinigungsverfahren vorgestellt. Sein Vorteil gegenüber den bisher publizierten Methoden (LYNEN, 1969; SCHWEIZER et al., 1973; STOOPS et al., 1978a)beruht vor allem auf einer deutlichen Reduzierung der für die Isolierung der Fettsäuresynthetase benötigten Zeit.

3.5.1. HERSTELLUNG EINES 100000xg-ÜBERSTANDS ALS AUSGANGSBASIS FÜR DIE FAS-ISOLIERUNG

130 g Hefe-Zellen (Stamm X2180-1A) wurden nach 2.14.2. durch Zermahlen in der DYNO-MILL aufgeschlossen. Der so erhaltene Rohextrakt wurde zur Gewinnung des 100000xg-Überstands einer verkürzten Zellfraktionierung durch differentielle Zentrifugation nach 2.16. unterworfen. Der als Ausgangsmaterial für die Reinigung der FAS dienende partikelfreie Überstand (45.3 mg/ml, 15855 mg Gesamtprotein) enthielt 0.1 M K-PO_4-Puffer, pH 7.0, 0.25 M Saccharose, 1 mM DTE, 3 mM EDTA-Na_2, 2 mM Benzamidin - Hydrochlorid und 1 mM PMSF.

3.5.2. AMMONIUMSULFATFRAKTIONIERUNG DES 100000xg-ÜBERSTANDS

Die Proteinsuspension wurde nach 2.17. einer fraktionierten $(NH_4)_2SO_4$-Fällung in den Grenzen von 0 - 36 und 36 - 51% Sättigung (= 1.4 - 2.0 M Ammonsulfat) unterzogen. Das Proteinsediment bei 51% Ammoniumsulfat

wurde in 40 ml 50 mM K-PO_4-Puffer, pH 7.0, mit 1 mM DTE, 2 mM EDTA, 2 mM Benzamidin und 1 mM PMSF resuspendiert und zweimal 3 h lang gegen je 2.5 l desselben Puffers dialysiert. Das Dialysat (110 ml, 38 mg Protein/ml) kann ohne größeren Aktivitätsverlust (nach Zusatz von 20% Glycerin) über mindestens 3 Monate bei -20°C aufbewahrt werden. Die Anreinigung durch Ammoniumsulfatfraktionierung ergab im allgemeinen eine Erhöhung der spezifischen Aktivität um den Faktor 3 - 4. Der Verlust an Gesamtaktivität betrug bei Beachtung entsprechender Vorsichtsmaßnahmen (Zusatz von Proteasehemmstoffen wie EDTA, Benzamidin und PMSF zu den verwendeten Puffern, Fällung in der Kälte unter langsamem Zutropfenlassen der Ammoniumsulfatlösung, vorsichtigem Resuspendieren der Proteinpräzipitate) zwischen 20 und 30% (s. Tab. 3-6):

Tab. 3-6: Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung des 100000xg-Überstands

Reinigungsschritt+	Protein (mg)	Spezif.Akt. (mU/mg)	Gesamt-Akt. (mU)	Reinigungsfaktor	Ausbeute (%)
Ü-100	15855	20.15	319478	1	100
DS 51%	4180	60.5	252890	3	80.4

+Ü-100 = 100000xg-Überstand, DS 51% = Dialysat des 51%-Ammonsulfatsediments. Enzymaktivität: 1 milliunit (mU) entspricht dem Verbrauch von 2 nMol NADPH pro min bei 30°C = 1 nMol Malonyl-CoA/min. Definition nach LYNEN (1969).

3.5.3. IONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE AN DEAE-CELLULOSE

Anreinigung von Fettsäuresynthetasen aus diversen Organismen durch Chromatographie an DEAE-Cellulose wird in der Literatur des öfteren beschrieben (DUTLER et al., 1971; KNOCHE & KOTHS, 1973; VANCE et al., 1973; KAWAGUCHI & OKUDA, 1977; KIM et al., 1977; GIOMPRES & PACKTER, 1978; HARDIE & COHEN, 1978; STOOPS et al., 1979).

Versuche, dieses Verfahren auch für die Reinigung von Hefe-FAS zu verwenden, sind jedoch bisher nicht publiziert worden. Im folgenden wurde daher die Möglichkeit untersucht, die Fettsäuresynthetase aus S.cerevisiae mit Hilfe dieser Methode teilweise zu reinigen. Da zudem die Isolationsprozedur für die C.cohnii-FAS ebenfalls die Ionenaustauschchromatographie an DE-52 bzw. DEAE-Sephadex-A25 beinhaltete (s. 3.6.), konnte das Verhalten der beiden Enzyme während dieses Reinigungsschritts verglichen werden.

70 g DEAE-Cellulose (WHATMAN DE-52, 'preswollen') wurden nach 2.18.1.2. äquilibriert und in eine Säule mit 5 cm Durchmesser gefüllt. Nach Absitzenlassen und Spülen des Gels betrug die Füllhöhe 7 cm. Die Chromatographie erfolgte nach 2.18.1.3. bei +4°C und einer Durchflußgeschwindigkeit von 60 ml/h. Aufgetragen wurden 35 ml (1330 mg Protein) des resuspendierten und dialysierten 51%-Ammonsulfatsediments aus 3.5.2. Es wurden Fraktionen à 12 ml gesammelt. Die Säule wurde mit Puffer A (0.05 M K-PO_4-Puffer, s. 2.18.1.1.) gewaschen, bis die Proteinabsorption bei 280 nm unter 0.2 abgesunken war. Ein Großteil des gebundenen Proteins wurde anschließend mit einem Puffer höherer Leitfähigkeit (0.25 M an K-PO_4, Puffer C aus 2.18.1.1.) eluiert. Nachwaschen des Gels mit 0.5 M K-PO_4-Puffer (Puffer D) führte zur Elution von weiterem Proteinmaterial, worin allerdings keine FAS-Aktivität nachzuweisen war. Die Fraktionen des Säulendurchlaufs ("DL", Frakt. 8 - 24, Abb. 3-9) wurden ebenso wie die Eluatfraktionen bei 0.25 M K-PO_4 ("EL", Frakt. 43 - 54) vereinigt und mit 3.8 M Ammoniumsulfatlösung auf 51% Sättigung gebracht (= 2.0 M). Die so gewonnenen Proteinpräzipitate wurden in einem kleinen Volumen Puffer C (mit 2 mM Benzamidin und 1 mM PMSF) resuspendiert und 2 x 2 h lang gegen die jeweils 100fache Menge desselben Puffers in der Kälte (+4°C) dialysiert. Die Dialysate sind, mit 20% Glycerin versetzt, bei -20°C mindestens 8 Wochen haltbar.

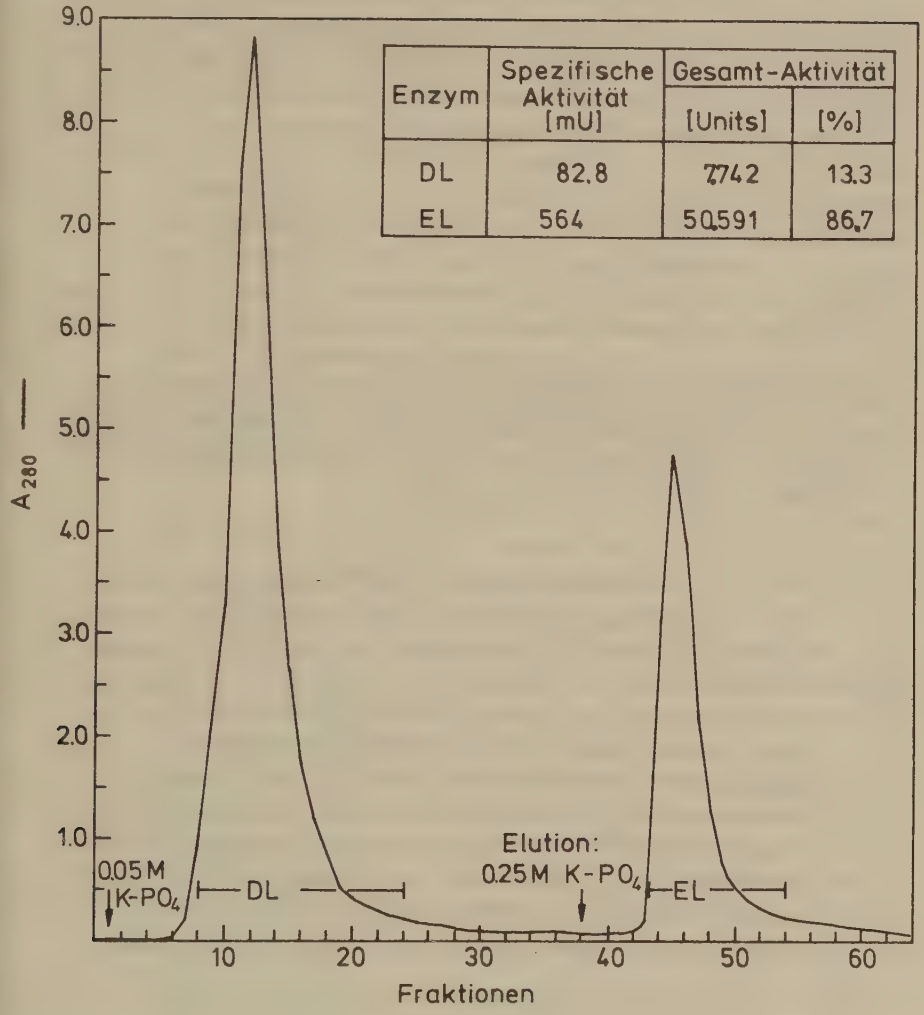


Abb. 3-9: Säulenchromatographie von Hefe-FAS an DE-52.
Erläuterungen s. Text zu 3.5.3.
A_{280} = Proteinabsorption bei 280 nm.

Tab. 3-7: Partielle Reinigung der Fettsäuresynthetase aus S.cerevisiae durch Ionenaustauschchromatographie an DE-52

Reinigungs-schritt[+]	Protein (mg)	Spezif.Akt. (mU/mg)	Gesamt-Akt. (mU)	Reinigungs-faktor	Ausbeute (%)
Auftrag (DS 51%)	1330	60.5	80465	1	100
DE-52-DL, konz.	93.5	82.2	7742	1.4	9.6
DE-52-EL, konz.	89.7	564	50591	9.3	62.9

[+]DS 51% (Auftrag) = Dialysat des 51%-Ammonsulfatsediments aus 3.5.2.; DE-52-DL, konz. = vereinigte, durch Ammonsulfatfällung konzentrierte und dialysierte Fraktionen des Säulendurchlaufs (s.Text); DE-52-EL, konz. = vereinigte und wie die des Säulendurchlaufs behandelte Fraktionen des Eluats bei 0.25 M K-PO_4. Einheiten der Enzymaktivität: s. Tab. 3-6.

Bei der partiellen Reinigung der Fettsäuresynthetase aus S.cerevisiae mittels Ionenaustauschchromatographie an DE-52 wurde die Enzymaktivität nahezu vollständig an das Gelmaterial gebunden (s. Tab. 3-7 und Abb. 3-9) und konnte durch Erhöhung der Ionenstärke des Säulenpuffers von 0.05 auf 0.25 M K-PO_4 wieder eluiert werden. Bei einer Anreicherung von 8.5 - 10fach im Vergleich zum aufgetragenen Dialysat des 51%-Ammoniumsulfatsediments aus 3.5.2. und bei Verlusten an Gesamtaktivität zwischen 20 und 35% in den verschiedenen Enzympräparationen stellt die DEAE-Cellulose-Chromatographie ein günstiges Verfahren für die Isolierung der Hefe-FAS dar.

3.5.4. GELFILTRATION ÜBER SEPHAROSE 6B UND SEPHAROSE CL-6B

Das hohe Molekulargewicht der Hefe-FAS im nativen Zustand (ca. 2.3 x 10^6 Dalton, STOOPS et al.,1978a) wurde bereits von LYNEN und Mitarbeitern sowie WAKIL und Mitarbeitern für die Reinigung des Enzyms nutzbar gemacht. So verwenden die bisher veröffentlichten Isolierungsmethoden als letzten Reinigungsschritt eine wiederholte, mehrstündige Ultrazentrifugation bei 100000 x g, wodurch die hochmolekulare Fettsäuresynthetase von Proteinen mit niedrigerem Molekulargewicht abgetrennt wird. Die Größe des nativen Multienzymkomplexes wurde auch in der vorliegenden Arbeit für die abschließende Reinigung der Hefe-FAS ausgenutzt. Dabei wurde die mehrfache, jeweils mindestens 6stündige Ultrazentrifugation (LYNEN, 1969; SCHWEIZER et al., 1973; STOOPS et al.,1978a) durch eine zeitlich kürzere Gelfiltration über Sepharose 6B ersetzt.

62 mg (in 5 ml) eines konzentrierten und dialysierten DE-52-Eluats (s. 3.5.3.) wurden auf eine 95 cm hohe Sepharose-CL-6B-Säule (Innendurchmesser: 1 cm) aufgetragen. Die Gelfiltration wurde in der Kälte (+4°C) bei einer Pumpgeschwindigkeit von 24 ml/h durchgeführt. Fraktionen à 12 ml wurden gesammelt. Die einzelnen Fraktionen wurden auf Proteingehalt (s. 2.6.) und auf Fettsäuresynthetase-Aktivität (spektrophotometrischer Test, s.2.7.7.2.) überprüft. Das Ergebnis zeigt Abb. 3-10. Die Enzymaktivität aufweisenden Fraktionen wurden jede für sich entweder durch Ammoniumsulfatfraktionierung (s.3.5.2.) oder wie die in Tab. 3-8 aufgeführten Enzymproben durch Ultrafiltration über AMICON-XM300-Membranen konzentriert.

Wie man der Abbildung entnehmen kann, eluiert die Hefe-FAS kurz hinter dem Ausschlußvolumen (v_o) der Säule. Die Enzymaktivitäten der einzelnen Fraktionen (6, 7 und 8) nach Konzentrierung über AMICON XM 300 sind in Tab. 3-8 zusammengefaßt:

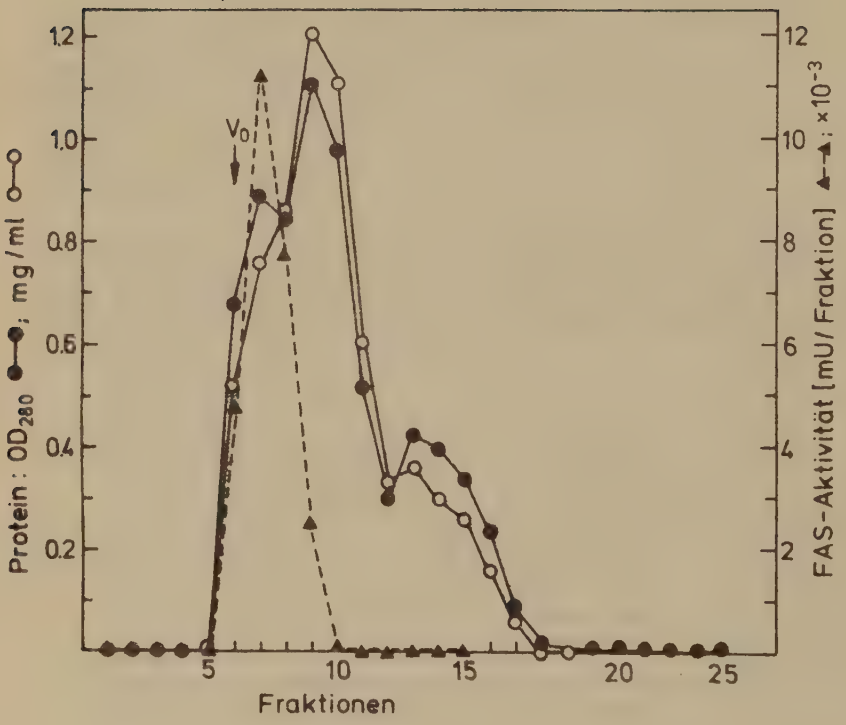


Abb. 3-10: Beispiel einer Gelfiltration von S.cerevisiae-FAS über Sepharose Cl-6B.

v_o = Ausschlußvolumen der Säule, bestimmt durch Gelfiltration von Blau Dextran 2000; Enzymatische Einheiten (mU): s.3.5.2., Tab. 3-6). Als Säulenpuffer wurde 0.25 M $K\text{-}PO_4$-Puffer, pH 7.0, mit 1 mM DTE und 1 mM EDTA benutzt.
OD_{280} = optische Dichte bei 280 nm.

Tab. 3-8: Sepharose-6B-Gelfiltration als abschließender Reinigungsschritt für die Isolierung der FAS aus S.cerevisiae

Reinigungsschritt/6B-Fraktionen+	Protein (mg)	Spezif.Akt. (mU/mg)	Gesamt-Akt. (mU)	Reinigungsfaktor	Ausbeute (%)
Auftrag (DE-52-EL, konz.)	62.1	564	35024	1	100
Fr. 6, konz.	2.4	952.2	2285	1.7	6.5
Fr. 7, konz.	4.9	1596	7820	2.8	22.3
Fr. 8, konz.	8.9	764.1	6801	1.4	19.4

+DE-52-EL, konz. (Auftrag) = durch Ammoniumsulfatfällung konzentriertes und dialysiertes Eluat (bei 0.25 M K-PO_4)der DE-52-Säule aus 3.5.3.; Fr. 6,7,8, konz. = durch Ultrafiltration über AMICON XM 300 konzentrierte Sepharose-CL-6B-Fraktionen. Enzymaktivität: s. 3.5.2., Tab. 3-6.

3.5.5. ZUSAMMENFASSUNG DER ISOLIERUNGSPROZEDUR FÜR DIE FETTSÄURESYNTHETASE AUS S.CEREVISIAE

Die Reinigung der Fettsäuresynthetase aus S.cerevisiae beinhaltete die unter 3.5.1. bis 3.5.4. im einzelnen besprochenen Reinigungsschritte:

1. Herstellung eines partikelfreien 100000xg-Überstands (s. 3.5.1.);
2. Ammoniumsulfatfraktionierung des Überstands in den Grenzen von 36-51% Sättigung (s. 3.5.2.);
3. Ionenaustauschchromatographie des resuspendierten und dialysierten, bei 51% Ammoniumsulfat erhaltenen Proteinsediments an DEAE-Cellulose (DE-52);
4. Gelfiltration des Eluats der DE-52-Säule über Sepharose CL-6B oder Sepharose 6B.

Die durch die abschließende Gelfiltration gereinigte Hefe-FAS (spezif.Aktivität: 1400-1900 mU/mg) erscheint in der nativen Polyacrylamidgradientengel-Elektrophorese (s. 2.10.2.) als eine Bande mit einem apparenten Mole-

Tab. 3-9: Zusammenfassende Reinigungstabelle für die Isolierung der Fettsäuresynthetase aus S.cerevisiae

Reinigungs-schritt+	Protein (mg)	Spezif.Akt. (mU/mg)	Gesamt-Akt. (mU)	Reinigungs-faktor	Ausbeute (%)
Ü-100	7762	20.7	160673	1	100
DS 51%	1869	65	121485	3.1	75.6
DE-52-DL, konz.	59.3	48.1	2852	-	2.4
DE-52-EL, konz.	103.2	606	62539	29.3	38.9
Seph.6B, Peakfrakt. konz.	9.8	1752	17170	84.6	10.7

+Reinigungsschritte: Bezeichnung der Enzymfraktionen analog zu Tab. 3-6 bis 3-8. Enzymaktivität: s. 3.5.2., Tab. 3-6.

kulargewicht von 2.2 bis 2.4 x 10^6 Dalton (vergl. Abb. 3-11). Eine schwächere Bande mit annähernd doppeltem Molekulargewicht konnte in manchen Fällen ebenfalls beobachtet werden. Unter denaturierenden Bedingungen, sowohl in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (s. 2.10.1.) nach LÄMMLI (1970) als auch in SDS/Harnstoffgelen (s. 2.10.4.), ließ sich der hochmolekulare Komplex in zwei distinkte Untereinheiten mit einem Molekulargewicht um 2 x 10^5 Dalton (s. Abb. 3-12) zerlegen. Die durch die o.a. Reinigungsprozedur erzielten Ausbeuten beliefen sich auf 10 - 18%. Das Enzym war, in 10 mM DTE, 20% Glycerin und 3 mM EDTA enthaltenden 0.2 M K-PO_4-Puffern, pH 6.5 bis 7.0, bei -20°C mindestens 6 Monate ohne signifikanten Aktivitätsverlust und ohne Veränderung des Bandierungsmusters in nativen und denaturierenden Polyacrylamidgel-Systemen haltbar. Proben, die auf diese Weise ein Jahr und länger aufbewahrt worden waren, zeigten in SDS- und SDS/Harnstoffgelen eine geringere Anfärbung der A (α)-Untereinheit im Vergleich zur kleineren B- oder ß-Untereinheit. Dieser Effekt wurde auch von STOOPS et al. (1978a) beobachtet und auf im FAS-Präparat vorhandene Proteaseaktivität zurückgeführt.

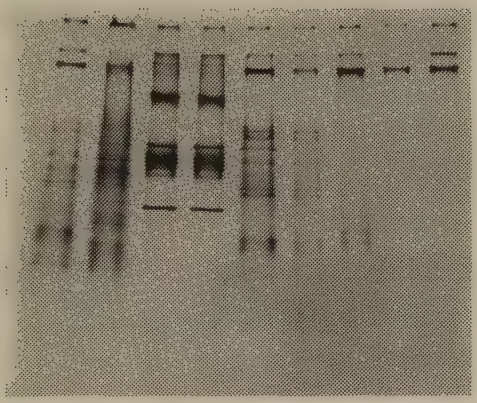


Abb. 3-11: Native Polyacrylamidgradientengel-Elektrophorese nach 2.10.2. von verschiedenen Reinigungsschritten der Hefe-FAS-Isolation

Aufgetragen wurden (von links nach rechts): 69 µg DE-52-EL, konz.; 300 µg DS 51%; 20 µl und 30 µl Eichprotein-Mix (s. 3.5.6.); 58 und 29 µg Sepharose-CL-6B-Fraktion 8 (aus Abb. 3-10); 58 und 29 µg -Fraktion 7; 48 µg -Fraktion 6.

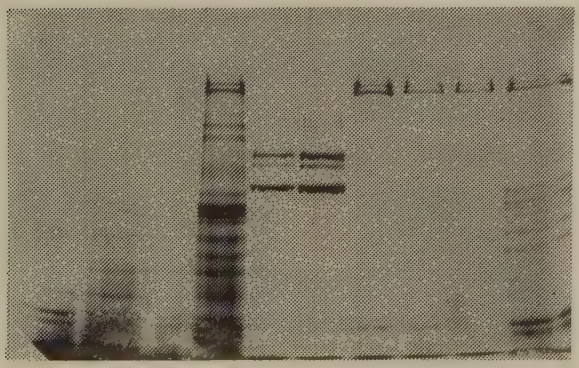


Abb. 3-12: 6%-SDS-PAGE von Hefe-FAS-Reinigungsschritten (n. 2.10.1.)

Aufgetragen wurden (von links nach rechts): 400 µg 100000xg-Überstand; 380 µg DS 51%; 110 µg DE-52-DL, konz.; 138 µg DE-52-EL, konz.; 2.5 und 5 µg Phosphorylase-Kinase; 12 µg Seph.-CL-6B-Fraktion 6; 10 und 20 µg -Fraktion 7; 29 µg -Fraktion 8 (Sepharose-CL-6B-Fraktionen: s. Abb. 3-10).

3.5.6. BESTIMMUNG DES APPARENTEN MOLEKULARGEWICHTS DER HEFE-FAS DURCH POLYACRYLAMIDGRADIENTENGEL-ELEKTROPHORESE UNTER NATIVEN BEDINGUNGEN

Das apparente Molekulargewicht des nativen Enzyms wurde durch Gradientengel-Elektrophorese nach 2.10.2. bestimmt. Als Eichproteine dienten: 1. Phosphorylase-Kinase (1.3 x 10^6 Dalton); 2. Ferritin-Dimer (9 x 10^5 Dalton); 3. Ferritin-Monomer (4.5 x 10^5 Dalton); 4. Catalase (2.4 x 10^5 Dalton) und 5. LDH (1.4 x 10^5 Dalton).

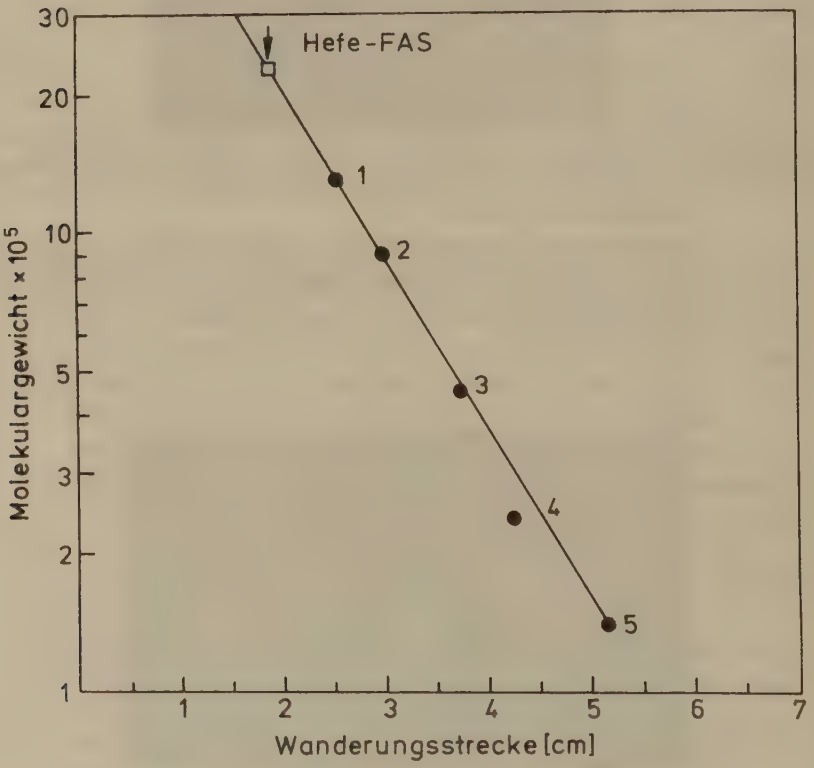


Abb. 3-13: Bestimmung des Molekulargewichts der Hefe-FAS durch native Polyacrylamidgradientengel-Elektrophorese.

Die Bezeichnung der Eichproteine entspricht der Numerierung im Text (Molekulargewichtsangaben: nach DARNALL & KLOTZ, 1975).

Für den nativen Enzymkomplex der S.cerevisiae-FAS wurde aus dem Vergleich von 10 verschiedenen Elektrophoresen ein apparentes Molekulargewicht von 2.3 (± 0.1) x 10^6 Dalton ermittelt (s. Abb. 3-13).

3.5.7. BESTIMMUNG DES APPARENTEN MOLEKULARGEWICHTS DER HEFE-FAS-UNTEREINHEITEN DURCH POLYACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESEN UNTER DENATURIERENDEN BEDINGUNGEN

Das Molekulargewicht der beiden distinkten Untereinheiten der S.cerevisiae-FAS wurde durch Elektrophorese in SDS- (s. 2.10.1.) bzw. SDS/Harnstoff-Polyacrylamidgelen (s. 2.10.4.) bestimmt. Als Eichproteine dienten: 1. Urease (240000 Dalton); 2. E.coli-RNA-Polymerase (ß'= 165000, ß= 155000, σ= 89000 Dalton); 3. ß-Galactosidase (135000 Dalton); 4. Albumin (BSA; 67000 Dalton). Das aus dem Vergleich von 7 Elektrophoreseläufen ermittelte Molekulargewicht der Untereinheiten betrug für A (α) 213000 (± 3000), für B (ß) 205000 (± 3000) Dalton.

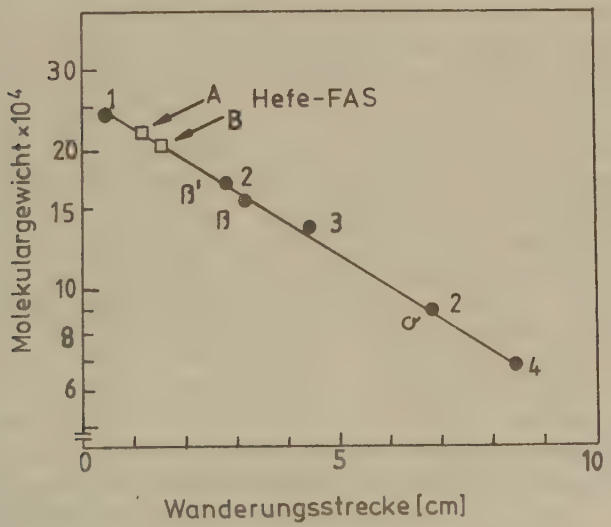


Abb. 3-14: Molekulargewichtsbestimmung der Hefe-FAS-Untereinheiten durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (s. 2.10.1.). Bezeichnung der Eichproteine s. Text; Molekulargewichtsangaben nach DARNALL & KLOTZ (1975).

3.6. REINIGUNG DER FETTSÄURESYNTHETASE AUS C.COHNII

Im folgenden wurde versucht, die Fettsäuresynthetase aus C.cohnii mit einem z.T. analogen zu dem für die Hefe-FAS entwickelten Reinigungsgang (s.3.5.) zu isolieren. Als Ausgangsmaterial für die Enzympräparation diente der aus spätlogarithmischen Zellen gewonnene 100000xg-Überstand, dessen Kapazität zur de novo-Biosynthese langkettiger Fettsäuren bereits näher untersucht wurde (s.3.4.). Die besondere Problematik, die bei der Reinigung der C.cohnii-FAS auftrat (besondere Instabilität des Enzyms, starke Anfälligkeit gegenüber endogenen Proteasen, geringe enzymatische Aktivität im Vergleich zu bekannten Fettsäuresynthetasen, z.B. zur Hefe-FAS) soll eingehend besprochen werden.

3.6.1. HERSTELLUNG EINES 100000xg-ÜBERSTANDS ALS AUSGANGSMATERIAL FÜR DIE FAS-ISOLIERUNG

Versuche zur Reinigung der C.cohnii-FAS gingen routinemäßig von 80 - 120 g Zellen aus, die gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase (nach 5-6 Tagen, s. 3.1.) geerntet worden waren. Benutzt wurden sowohl Zellen, die direkt nach dem Ernten verarbeitet wurden, als auch solche, die nach dem Ernten als 'packed cells' bei -20°C aufbewahrt worden waren. Unterschiede in der Fettsäuresynthetase-Aktivität zwischen direkt nach dem Ernten aufgeschlossenen und bei -20°C bis zu drei Monaten aufbewahrten Zellen waren nicht feststellbar. Eine Ausnahme bildete eine Enzympräparation aus Zellen, die 9 Monate lang eingefroren gewesen waren. Hier war die Fettsäure-Biosynthesekapazität des 100000xg-Überstands um rund 40% reduziert.

Die geernteten, z.T. bei -20°C gehaltenen Dinoflagellaten wurden nach dem Waschen (s. 2.13.1.2.) in 0.25 M Saccharose enthaltendem Aufschlußpuffer (Puffer A oder B aus 2.14.2.1.) resuspendiert (ca. 100 ml Puffer/30 g Zellen) und nach 2.14.2.2. durch Zermahlen mit bleifreien Glasperlen in der DYNO-MILL aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde nach 2.16. einer verkürzten Zell-

fraktionierung mittels differentieller Zentrifugation unterworfen. Der so gewonnene 100000xg-Überstand (2900-3500 mg Protein aus 100 g Zellen) diente als Ausgangsbasis für die FAS-Reinigung. Nennenswerte 2-Enoyl-CoA-Hydratase-Aktivität (Crotonase-Aktivität) als Anzeichen für während des Zellaufschlusses bzw. der nachfolgenden Zentrifugationsschritte zerstörte Mitochondrien ließ sich in den für die FAS-Isolierung verwendeten 100000xg-Überständen nicht nachweisen (Test nach NOYES & BRADSHAW, 1973; s. 2.7.5.). Daher wurde davon ausgegangen, daß in den Überständen der Ultrazentrifugation keine die Fettsäurebiosynthese störenden ß-Oxidationsenzyme vorhanden waren.

.6.2. AMMONIUMSULFATFRAKTIONIERUNG DES 100000xg-ÜBERSTANDES

Durch fraktionierte $(NH_4)_2SO_4$-Fällung des 100000xg-Überstands von 36 - 51% Sättigung (entsprechend 1.4 - 2.0 M Ammonsulfat) mit flüssigem, 3.8 M $(NH_4)_2SO_4$ nach 2.17. konnte im Durchschnitt eine 2.5- bis 3.5fache Anreicherung der FAS-Aktivität erzielt werden. Die Ausbeute an Gesamtaktivität betrug stets zwischen 50 und 65%, so daß auch bei schonendstem Vorgehen (langsamem Zutropfenlassen der Ammonsulfatlösung, vorsichtigem Rühren bei 0° oder $+4^\circ C$, Erhöhung der DTE-Konzentration in den benutzten Lösungen auf bis zu 5 mM, Zusatz von Proteasehemmern, gefühlvollem Resuspendieren der Proteinpräzipitate) der Verlust an Enzymaktivität mindestens 35% betrug. Fraktionierte Fällungen mit festem, fein gemörsertem Ammoniumsulfat brachten zwar auch eine Erhöhung der spezifischen Aktivität der C.cohnii-FAS um das Zwei- bis Zweieinhalbfache, die wiedergefundene Gesamtaktivität belief sich jedoch in allen Fällen auf weniger als 50%, so daß der Fällung mit flüssigem Ammonsulfat der Vorzug gegeben wurde. Das Ergebnis einer typischen Ammoniumsulfatfraktionierung eines 100000xg-Überstands ist in Tab. 3-10 zu finden.

Tab. 3-10: Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung des 100000xg-Überstands von C.cohnii

Reinigungs-schritt[+]	Protein (mg)	Spezif.Akt. (µU/mg)[++]	Gesamt-Akt. (µU)[++]	Reinigungs-faktor	Ausbeute (%)
Ü-100	2575	118.1	304107	1	100
DS 36%	242	63.9	15464	-	5.1
DS 51%	495	361.4	178893	3.1	58.8
DÜ 51%	1560	36.7	57252	-	18.8

[+]Ü-100 = 100000xg-Überstand, DS 36% bzw. DS 51% = resuspendierte und dialysierte Proteinpräzipitate, DÜ 51% = dialysierter Überstand der 51%-Ammonsulfatfällung;

[++]Enzymaktivität: 1 µU = die Enzymmenge, die unter den Bedingungen des Tests nach 2.7.8.1. 1 pMol radioaktives Malonyl-CoA pro min umsetzt.

Das 51%-Ammoniumsulfatsediment wurde in einem kleinen Volumen eines der Puffer resuspendiert, die für die nachfolgenden Säulenchromatographien (s. 2.18.1. und 2.18.2.) benutzt wurden, und entweder 2 x 2 h lang gegen die jeweils 150-200fache Menge desselben Puffers bei +4°C dialysiert, oder aber vor dem Säulenauftrag mindestens 1:20 im entsprechenden Puffer verdünnt. Das resuspendierte und dialysierte Proteinpräzipitat ist bei Vorhandensein von 5 mM DTE und 20% Glycerin in der Lösung bei -20°C mindestens 8 Wochen lang haltbar. Der Aktivitätsverlust beim Wiederauftauen so aufbewahrten Enzyms betrug zwischen 5% (Auftauen bei +4°C) und 10% (Auftauen bei Raumtemperatur). Wurde die Proteinsuspension im gleichen Puffer in Eis aufbewahrt, so war ein Verlust an enzymatischer Aktivität von rund 50% innerhalb von 3-4 Tagen zu verzeichnen. Auch durch den Zusatz von Proteasehemmern (3 mM EDTA-Na_2, 2 mM Benzamidin und 1 mM PMSF, s. 3.6.3.2.) ließ sich der Zeitpunkt des 50%igen Verlusts an Gesamtaktivität nur um ca. 2 Tage hinausschieben.

3.6.3. VERSUCHE ZUR HEMMUNG BZW. ABTRENNUNG VON PROTEOLYTISCHER AKTIVITÄT AUS C.COHNII-FAS-PRÄPARATIONEN

Labilität von Fettsäuresynthetasen aus diversen eukaryotischen Organismen gegenüber proteolytischem Angriff durch intrazelluläre Enzyme, die beim Zellaufschluß durch Beschädigung oder Zerstörung der Lysosomen freigesetzt werden, wurde schon des öfteren beobachtet (SCHWEIZER et al., 1973; STOOPS et al., 1975; BUCKNER & KOLATTUKUDY, 1976; PASKIN & MAYER, 1976; STOOPS et al.,1978a,b). Aus diesem Grund wird den FAS-Präparationen bereits beim Gewebe- bzw. Zellaufschluß PMSF (GIOMPRES & PACKTER, 1978) oder eine Kombination aus PMSF und Benzamidin (STOOPS et al.,1978a) zugesetzt. Außerdem enthalten die verwendeten Pufferlösungen mindestens 1 mM EDTA zur Hemmung von Metalloproteasen. Durch diese Vorsichtsmaßnahmen gelang es den o.g. Autoren, die endogen vorhandene Proteaseaktivität, die z.B. bei der Hefe S.cerevisiae mit dem FAS-Multienzymkomplex assoziiert zu sein scheint (SCHWEIZER et al., 1973; STOOPS et al., 1975), wirksam zu unterdrücken.

Im 100000xg-Überstand aus spätlogarithmischen C.cohnii-Zellen (geerntet nach 5-6 Tagen Züchtungsdauer) war die proteolytische Aktivität sehr gering und in manchen Präparationen bereits bei 3 mM EDTA-Na_2 im Aufschlußpuffer mit dem Casein-Agar-Diffusionstest nach 2.7.6. nicht mehr nachweisbar. In aus stationären Zellen (10-12 Tage alt) gewonnenem 100000xg-Überstand war dagegen Proteaseaktivität stets in erhöhtem Maß vorhanden.

3.6.3.1. Einfluß der Ammoniumsulfatfällung auf die Aktivität endogen vorhandener Proteasen

Behandlung von partikelfreiem Überstand der Ultrazentrifugation aus 3.6.1. mit flüssigem Ammoniumsulfat führte zu einer drastischen Steigerung der proteolytischen Aktivität, die auch nach Entfernung des den Test störenden Ammonsulfats durch extensive Dialyse nachweisbar blieb (s. Tab. 3-11). Die Dialyse der mit $(NH_4)_2SO_4$ behandelten Proben wurde notwendig, da ein Proteaseakti-

vität vortäuschendes 'clearing' des trüben Casein-Agars bereits durch den Auftrag von (proteinfreier) Ammoniumsulfatlösung auf die Diffusionsplatten zu erzielen war. Zum Beweis der Aktivierung von latent vorhandenen Proteasen durch die für die Reinigung der FAS verwendete Ammonsulfatfraktionierung wurde ein 100000xg-Überstand, der keinerlei proteolytische Aktivität zeigte, wie in 3.6.2. mit 3.8 M $(NH_4)_2SO_4$-Lösung gefällt. Die erhaltenen Proteinpräzipitate wurden im gleichen Puffer resuspendiert, in dem sich auch der 100000xg-Überstand befunden hatte (0.1 M K-PO_4, pH 7.0, 1 mM DTE, 1 mM EDTA-Na_2) und zusammen mit dem Überstand der 51%-Fällung 16 h lang bei +4°C und zweimaligem Pufferwechsel gegen das jeweils 150fache Volumen o.a. Puffers dialysiert. Mit Hilfe des Casein-Agar-Diffusionstests nach 2.7.6. wurden die erhaltenen Fraktionen auf Vorhandensein von Proteinaseaktivität überprüft. Das Ergebnis zeigt Tab. 3-11:

Tab. 3-11: Aktivierung von im C.cohnii-100000xg-Überstand vorhandenen Proteasen durch $(NH_4)_2SO_4$-Fällung

Fraktion[+]	Protein (mg)	µg Protein im Test	Protease-Akt.[++] (cm Hof-ø)
Ü-100	23.0	100	-
		200	-
		300	-
DS 36%	4.64	16	0.15
		32	0.25
		48	0.30
DS 51%	3.92	14	0.20
		28	0.30
		42	0.40
DÜ 51%	12.1	13	0.15
		26	0.25
		39	0.30

[+]Bezeichnung der Fraktionen: s. Legende zu Tab. 3-10;

[++]Protease-Aktivität: angegeben sind die Durchmesser der proteolytischen Höfe in cm nach 20 h Inkubation bei Raumtemperatur (22°C).

Die nachfolgende Tabelle stellt den Versuch dar, die mit Hilfe des semiquantitativen Proteasetests nach 2.7.6. erzielten und in Tab. 3-11 aufgelisteten Werte in Form von relativen Enzymaktivitäten pro mg Protein bzw. pro Fraktion auszudrücken, um so einen Eindruck von der Verteilung der Proteinase-Aktivität über die einzelnen Fraktionen zu gewinnen:

Tab. 3-12: Verteilung der Protease-Gesamtaktivität über die Fraktionen der Ammoniumsulfatfällung

Fraktion[+]	Relative Proteaseaktivität[++] pro mg Protein	pro Fraktion	Anteil (%)
Ü-100	-	-	0
DS 36%	6.25	29.0	18.0
DS 51%	9.9	39.0	24.2
DÜ 51%	7.7	93.0	57.8
		161.0	100.0

[+]Die genannten Fraktionen entsprechen denen aus Tab.3-11;

[++]Relative Proteaseaktivität: die Enzymaktivitäten aus Tab.3-11 (cm Hof-ø nach 20 h bei 22°C) wurden gemittelt und auf 1 mg Protein hochgerechnet. Es ist zu beachten, daß es sich hierbei um artifizielle Zahlen handelt, deren Sinn in der Veranschaulichung der prozentualen Verteilung der Proteaseaktivität über die Fraktionen der Ammoniumsulfatfällung liegt.

Die Auswertung der in Tab. 3-11 und 3-12 aufgeführten Daten zeigt, daß die Fraktion mit der höchsten relativen spezifischen Proteaseaktivität das dialysierte Sediment der 51%-Ammonsulfatfällung ist. Der Hauptanteil der insgesamt gefundenen Proteaseaktivität (rund 58%, s.o.) ist jedoch erst jenseits einer Ammoniumsulfat-Konzentration von 2.0 M präzipitierbar. Da im die Fettsäuresynthetase beinhaltenden Dialysat des 51%-$(NH_4)_2SO_4$-Sediments proteolytische Aktivität eindeutig nachweisbar war, wurde im folgenden versucht, diese entweder durch den Zusatz von spezifischen Hemmstoffen zu unterdrücken oder durch geeignete chromatographische Verfahren von der FAS abzutrennen.

3.6.3.2. Unterdrückung der proteolytischen Aktivität durch Zusatz von Proteasehemmstoffen

In den nachfolgend beschriebenen Versuchen sollte die Wirkung unterschiedlicher Mengen an EDTA, Benzamidin (ENSINCK et al., 1972; JEFFCOATE & WHITE, 1974) und PMSF (FAHPNEY & GOLD, 1963; GOLDBERG, 1971; PROUTY & GOLDBERG, 1972; SEKAR & HAGEMAN, 1979; HATHAWAY & ADELSTEIN, 1979) sowie von Kombinationen der drei Hemmsubstanzen auf die Proteaseaktivität im dialysierten 51%-Ammoniumsulfatsediment des 100000xg-Überstands untersucht werden.

Dazu wurden kleine Portionen des partikelfreien Überstands aus 3.6.3.1. (jeweils 5 ml mit 50 mg Protein) mit 3.8 M $(NH_4)_2SO_4$-Stammlösung bei +4°C, wie in 3.6.2. bzw. 3.6.3.1. beschrieben, fraktioniert. Die erhaltenen Proteinpräzipitate bei 51% Sättigung wurden in je 1 ml 0.1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.0, mit 1 mM DTE resuspendiert, der zusätzlich die in Tab. 3-13 aufgeführten Hemmstoffe bzw. Hemmstoffkombinationen in den zu untersuchenden Konzentrationen enthielt. Die verschiedenen Proteinproben wurden anschließend zur Entfernung des Ammoniumsulfats 2 x 4 h lang bei +4°C gegen jeweils 200 ml des zugehörigen Resuspendierungspuffers dialysiert. Nach Abschluß der Dialyse wurden die Proteinlösungen mit den unterschiedlichen Hemmstoffkonzentrationen mit Hilfe des Casein-Agar-Diffusionstests (s.2.7.6.) auf Vorhandensein von Proteaseaktivität hin überprüft. Die Ergebnisse der einzelnen Versuche sind in Tab. 3-13 zusammengefaßt.

Tab. 3-13: Hemmung von Proteaseaktivität in 51%-Ammonsulfatsedimenten durch Dialyse gegen EDTA-, Benzamidin- und/oder PMSF-haltigen Kaliumphosphatpuffer

Hemmstoff/ -Kombination	Konzentration im Puffer (mM)	Protease-Aktivität[+] (cm Hof-ø)
$EDTA\text{-}Na_2$	1	0.45
	2	0.40
	3	0.40
	5	0.40
Benzamidin	1	0.35
	2	0.30
	4	0.30
PMSF	0.5	0.35
	1	0.20
	2	0.20
EDTA + Benzamidin	3 + 2	0.25
EDTA + Benzamidin + PMSF	3 + 2 + 1	0.10

[+]Proteaseaktivität: angegeben sind wie in Tab. 3-11 die Durchmesser der proteolytischen Höfe in cm nach 20stündiger Inkubation bei 22°C.
Die in die einzelnen Tests eingebrachte Proteinmenge betrug jeweils 40 µg.
Ein als Kontrolle verwendetes Proteinsediment, das gegen Puffer ohne Proteasehemmer dialysiert wurde, zeigte eine Enzymaktivität von 0.50 cm Hof-ø pro 40 µg und 20 h Inkubationsdauer.
Die bei den vorgenommenen Dreifach-Bestimmungen der verschiedenen Ansätze auftretenden Abweichungen betrugen ± 0.05 cm.

Aus den erhaltenen Enzymaktivitäten bei Anwesenheit verschiedener Konzentrationen der einzelnen Hemmstoffe läßt sich für die drei untersuchten Substanzen folgende Effektivitätsreihe aufstellen:

2 mM EDTA-Na_2 < 2 mM Benzamidin < 1 mM PMSF.

Als am wirksamsten, wenn auch nicht zu einer vollständigen Hemmung führend, erwies sich eine Kombination der drei Proteasehemmer aus 3 mM EDTA-Na_2, 2 mM Benzamidin und 1 mM PMSF, welche daher bei Ammoniumsulfatfraktionierungen des 100000xg-Überstands zugesetzt wurde oder bereits im für den Zellaufschluß verwendeten Puffer enthalten war. Im zweiten Fall wurde mit 3.8 M $(NH_4)_2SO_4$-Lösung präzipitiert, die 2 mM Benzamidin und 3 mM EDTA enthielt. PMSF wurde den diversen Lösungen aus einer 25%igen Stammlösung (in Aceton) stets frisch zugesetzt (SCHWEIZER et al., 1973). Höhere PMSF-Konzentrationen als 2 mM erwiesen sich als unpraktisch, da aus Enzymsuspensionen, die diese oder eine größere Menge des Hemmstoffs enthielten, beim Wiederauftauen der Proben von -20°C Protein ausfiel. In solchen Enzymlösungen war danach keine nennenswerte FAS-Aktivität mehr nachzuweisen.

3.6.3.3. Abtrennung von Proteasen durch Affinitätschromatographie an Casein-Sepharose 4B

Die sich bei der Isolierung von intakten Enzymen oftmals als störend erweisende endogene Proteaseaktivität kann affinitätschromatographisch durch Bindung an an Sepharose 4B gekoppeltes Casein aus den Proteinsuspensionen entfernt werden (SPERLING et al., 1979).

Durch eine Vereinfachung der von den o.g. Autoren beschriebenen Methode (s. 2.18.4.) gelang es, die in während des Reinigungsgangs der C.cohnii-FAS anfallenden Fraktionen enthaltene Proteaseaktivität von der Fettsäuresynthetase abzutrennen. Ein Beispiel für eine solche Affinitätschromatographie zeigt die nachfolgende Abbildung:

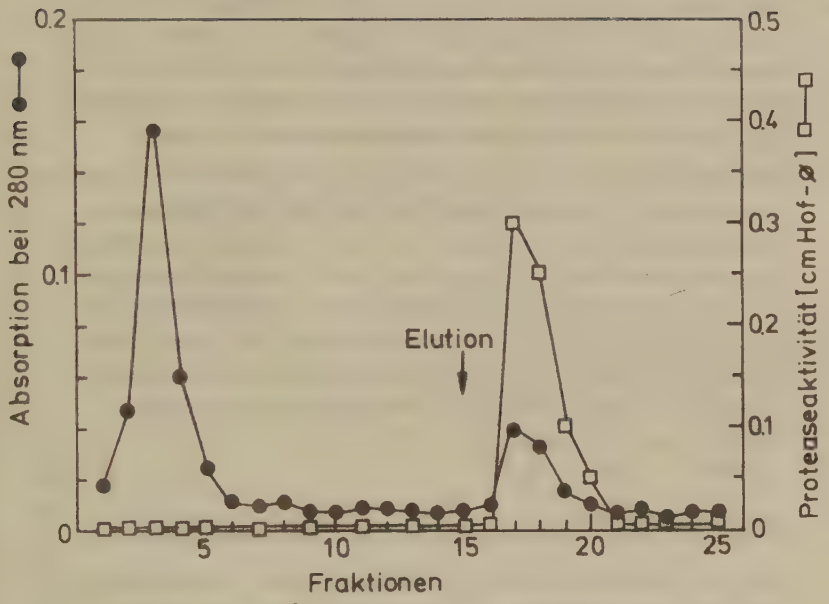


Abb. 3-15: Bindung von endogenen Proteasen aus C.cohnii-Enzymextrakten an Casein-Sepharose 4B.

Die proteolytische Aktivität wurde ausgedrückt als Hof-ø in cm pro 35 µl nach 6 h Inkubation bei Raumtemperatur.
Eluiert wurde mit 2.5 M KCl in Laufpuffer.

Aufgetragen wurden im obigen Beispiel 1.82 mg eines durch Ammoniumsulfatfällung konzentrierten Eluats der DEAE-Cellulose-Chromatographie (s. 3.6.4.). Die Enzymsuspension zeigte neben der FAS- auch starke Proteaseaktivität (0.65 cm Hof-ø/40 µg Protein und 2 h). Die Durchführung der Affinitätschromatographie erfolgte nach 2.18.4. Gesammelt wurden Fraktionen à 2.5 ml, denen nach Entfernung des KCl durch Dialyse jeweils 35 bzw. 70 µl zur qualitativen Proteasebestimmung (s.2.7.6.) entnommen wurden. Im Durchlauf der Säule war keine proteolytische Aktivität mehr feststellbar, selbst nicht nach Konzentrierung durch Ammoniumsulfatfällung (61% Sättigung). Demgegenüber zeigte der kleine, mit

2.5 M KCl eluierte Proteingipfel deutliche Proteaseaktivität (0.30 cm Hof-ø/35 µl und 6stündiger Inkubation bei 22°C; Fraktion 17). FAS-Aktivität wurde nicht an die Gelmatrix gebunden, sondern befand sich ausschließlich im Durchlauf der Säule. 96% der aufgegebenen FAS-Aktivität wurden wiedergefunden.

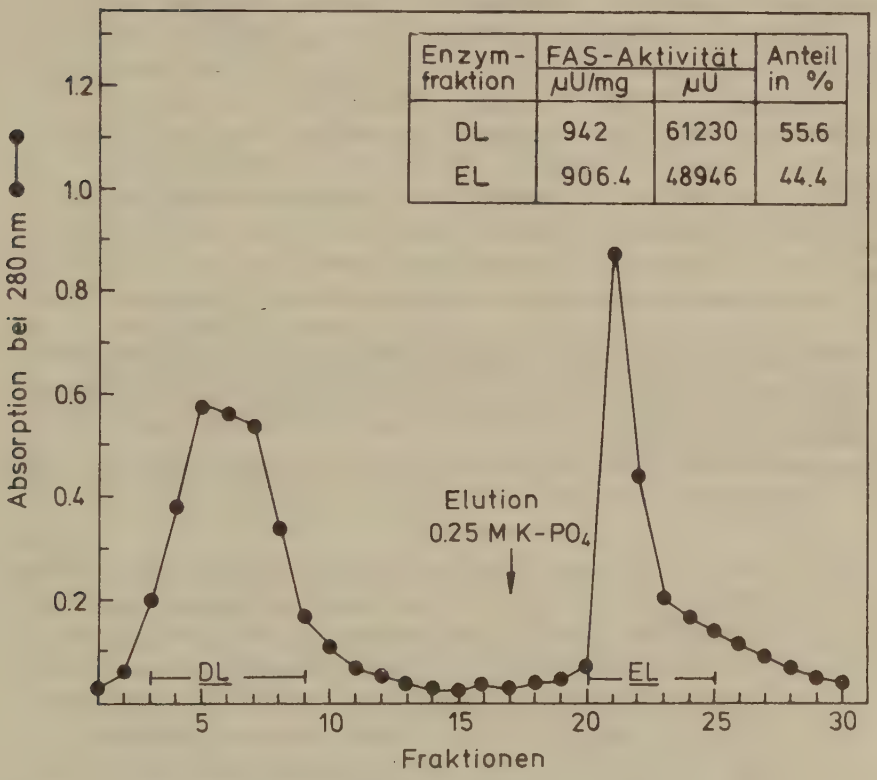
Obwohl die Affinitätschromatographie an Casein-Sepharose eine schnelle und effektive Abtrennung von Proteasen ergab, wurde dieses Verfahren für die endgültige Reinigungsprozedur der C.cohnii-FAS nicht weiter verwendet, da - wie später gezeigt werden soll - durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex A25 eine vollständige Abtrennung der proteolytischen Aktivität bei gleichzeitiger Anreicherung der Fettsäuresynthetase erzielt werden konnte (s. 3.6.5.).

3.6.4. IONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE AN DEAE-CELLULOSE

Da die Chromatographie an DEAE-Cellulose (WHATMAN DE 52) bei der Isolierung der FAS aus Hefe eine hohe Anreicherung erbracht hatte (9-10fach, s. 3.5.3.), wurde im folgenden versucht, sich dieses Verfahren für die Reinigung der C.cohnii-FAS ebenfalls nutzbar zu machen.

Dazu wurde aus spätlogarithmischen Zellen gewonnener 100000xg-Überstand durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (36-51% Sättigung) angereinigt. Nach Resuspendierung des 51%-$(NH_4)_2SO_4$-Sediments in einem kleinen Volumen des verwendeten Säulenpuffers (Puffer A aus 2.18.1.1., 50 mM an Kaliumphosphat) wurde zweimal gegen die jeweils 200fache Menge dieses Puffers in der Kälte dialysiert (s. 2.17.2.). Das Dialysat (427 mg Protein mit einer FAS-Aktivität von 309.6 µU/mg) wurde auf eine nach 2.18.1.2. vorbehandelte DE-52-Säule mit einem Innendurchmesser von 2.2 cm (Füllhöhe 16 cm) aufgetragen. Die Durchführung der Chromatographie erfolgte nach 2.18.1.3. bei +4°C und einer Durchflußrate von 54 ml/h. Es wurde so lange mit Puffer A (s.o.) gespült, bis die Proteinabsorption bei 280 nm unter 0.1 abgesunken war. Anschließend wurde mit Puffer C aus 2.18.1.1.

(0.25 M K-PO_4-Puffer) eluiert. Die Fraktionen (je 13 ml) des Säulendurchlaufs (3-9, s. Abb. 3-16) wurden ebenso wie die des Eluats (20-25) vereinigt und entweder durch Ammoniumsulfatfällung oder - wie im vorliegenden Fall - durch Ultrafiltration über AMICON XM 100A konzentriert. Nachwaschen des Säulenmaterials mit 0.5 M K-PO_4-Puffer erbrachte die Desorption weiteren Proteins, das jedoch keinerlei FAS-Aktivität aufwies.



Enzym-fraktion	FAS-Aktivität µU/mg	FAS-Aktivität µU	Anteil in %
DL	942	61230	55.6
EL	906.4	48946	44.4

Abb. 3-16: Ionenaustauschchromatographie von C.cohnii-FAS an DEAE-Cellulose (DE 52) in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer. Elution durch 0.25 M K-PO_4-Stoß.
FAS-Aktivität: s. Legende zu Tab. 3-14.

Die Daten zur Anreicherung der C.cohnii-FAS durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung mit anschließender Ionenaustauschchromatographie an DE 52 (s. Abb. 3-16) sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefaßt:

Tab. 3-14: Anreicherung von C.cohnii-FAS durch Ammonsulfatfraktionierung und Chromatographie an DEAE-Cellulose (DE 52)

Enzym-fraktion[+]	Protein (mg)	Spezif.Akt. (µU/mg)[++]	Gesamt-Akt. (µU)[++]	Reinigungs-faktor	Ausbeute (%)
Ü-100	2640	96	253440	1	100
DS 51%	427	309.6	132199	3.2	52
DE-DL, konz.	65	942	61230	9.8	24
DE-EL, konz.	54	906.4	48946	9.4	19

[+]Enzymfraktionen: Ü-100 = 100000xg-Überstand; DS 51% = resuspendiertes und dialysiertes Sediment der 51%-Ammonsulfatfällung; DE-DL,konz. bzw. DE-EL,konz. = durch Ultrafiltration über AMICON XM 100A konzentrierte Fraktionen des Säulendurchlaufs bzw. des Eluats aus Abb. 3-16.

[++]Enzymaktivität: 1 µU = 1 pMol Malonyl-CoA umgesetzt/min bei 22°C.

Wie den in obiger Tabelle aufgeführten Daten zu entnehmen ist, wurden rund 83% der auf den Anionenaustauscher aufgetragenen FAS-Aktivität wiedergefunden. Dabei verteilte sich die enzymatische Aktivität stets auf beide Proteinfraktionen, wobei die Gesamt- wie auch die spezifische Aktivität im Durchlauf der Säule zumeist etwas höher lag als im Eluat (hier: 3fache Anreicherung der spezif. Aktivität und 46.3% der aufgetragenen Aktivität im Durchlauf gegenüber einer 2.9fachen Anreicherung und einem Anteil von 37% im Eluat). Dieses 'splitting' der C.cohnii-FAS-Aktivität war nicht auf eine zu geringe Gelkapazität zurückzuführen, da derselbe Effekt auch bei DE-52-Chromatographien auftrat, bei denen das mg Protein/g

Gel-Verhältnis 1:1 oder weniger betrug (im Vergleich zu 15:1 im angeführten Beispiel). Durch nachfolgend aufgeführte Variationen der Chromatographiebedingungen wurde versucht, eine größere Menge des Enzymmaterials an den Ionenaustauscher zu binden:
a) Reduzierung der Ionenstärke des Säulenpuffers bis auf 20 mM $K\text{-}PO_4$, b) Ersetzen des Kaliumphosphat-Puffers durch 50 mM Tris-HCl (Puffer B aus 2.18.1.1.), c) Durchführung der Chromatographie in alkalischerem pH-Bereich mit 50 mM Tris-HCl-Puffer zwischen pH 7.4 und 8.0. Die genannten Veränderungen konnten jedoch die annähernd gleiche Aufteilung der FAS-Aktivität zwischen Durchlauf und Eluat nicht verhindern. Für die Reinigung von Fettsäuresynthetasen aus anderen Organismen wird von einigen Autoren empfohlen, die DEAE-Cellulose-Chromatographie bei 22-23°C durchzuführen, wodurch die Bindungskapazität des Anionenaustauschers erhöht wird (KIM et al., 1977; HARDIE & COHEN, 1978).Dies führte bei der Isolierung der C.cohnii-FAS nicht zum Erfolg, sondern resultierte lediglich in einer geringeren Ausbeute bei kaum nennenswerter Anreinigung. Ausführung der DE-52-Chromatographie in der Kälte unter Zusatz von EDTA und Benzamidin (Endkonzentration im Säulenpuffer: 3 bzw. 2 mM) hatte zwar keinen Einfluß auf die erwähnte Aufspaltung der Enzymaktivität, war jedoch insofern von Vorteil, als eine generelle Erhöhung des enzymatischen Umsatzes um das 1.5-2fache zu beobachten war.

Eine Erhöhung der spezifischen Aktivität des an die Säule gebundenen FAS-Anteils ließ sich, wie in Abb. 3-17 gezeigt wird, durch Elution mittels eines Phosphatpuffer-Gradienten erzielen (0.05-0.5 M $K\text{-}PO_4$, s. 2.18.1.1. und 2.18.1.3.). Nach Vereinigung und Konzentrierung (AMICON XM 100A) von so gewonnenen Durchlauf- bzw. Eluatfraktionen ergab sich folgendes Bild: 40-55% der wiedergefundenen Aktivität erschienen im Durchlauf der Säule, 45-60% in den Fraktionen des Eluats. Dabei zeigte das eluierte Material eine um den Faktor 1.5-2.5 höhere spezifische Aktivität als das im Säulendurchlauf wiedergefundene. Das Ergebnis einer auf diese Weise durchgeführten DEAE-Cellulose-Chromatographie ist in Tab. 3-15 zusammengefaßt.

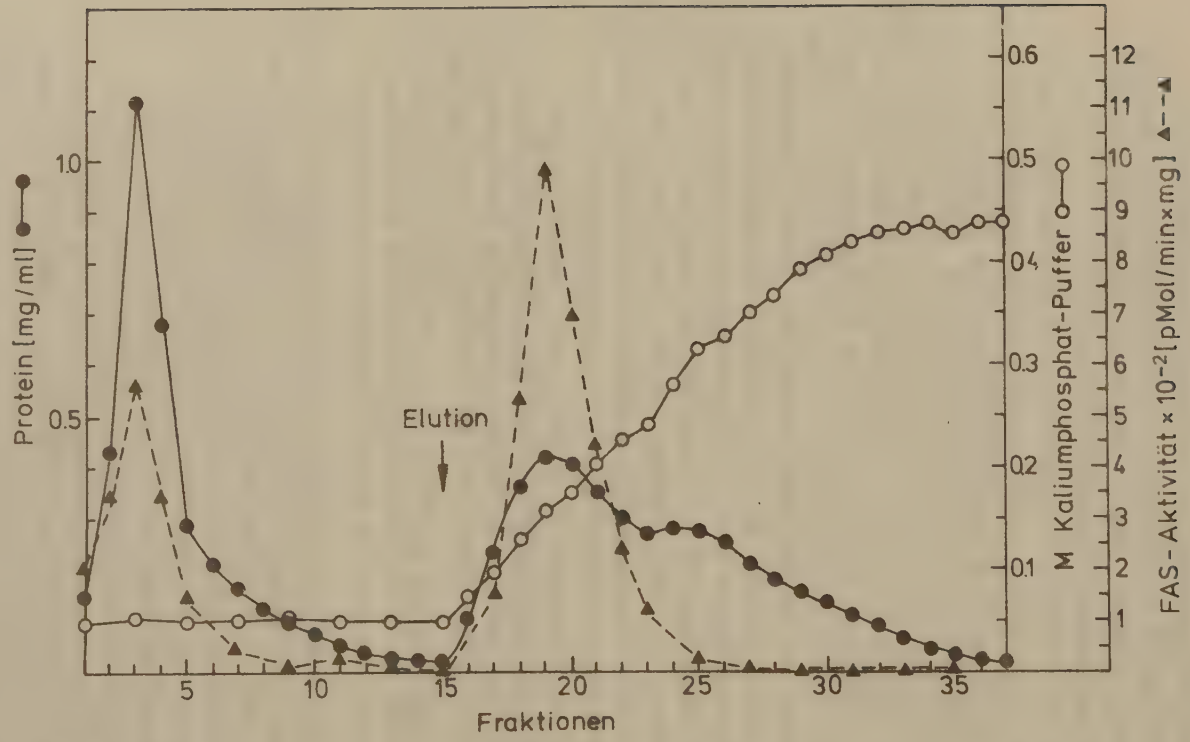


Abb. 3-17: Ionenaustauschchromatographie von C.cohnii-FAS an DEAE-Cellulose (DE 52). Die Elution erfolgte mittels Phosphatpuffer-Gradienten von 0.05 bis 0.5 M $K\text{-}PO_4$. Aufgetragen wurden auf die Säule (5 x 6.5 cm) 88 mg Protein eines 51%-Ammonsulfatsediments aus 3.6.2. Gesammelt wurden Fraktionen à 8 ml.

Tab. 3-15: Anreicherung von C.cohnii-FAS durch Ionenaustauschchromatographie an DE 52 bei Elution der gebundenen Proteine durch linearen Phosphatpuffer-Gradienten

Enzymfraktion[+]	Protein (mg)	Spezif. Akt. (µU/mg)[++]	Gesamt-Akt. (µU)	Reinigungsfaktor	Ausbeute (%)
DS 51%	78.0	238	18564	1	100
DE-DL, konz.	14.25	488.2	6957	2	37.5
DE-El, konz.	9.6	784.5	7531	3.3	40.6

[+]Enzymfraktionen: DS 51% und DE-DL,konz. siehe Legende zu Tab.3-14, DE-EL,konz. = vereinigte Fraktionen zwischen 0.125 und 0.175 M Kaliumphosphatpuffer, über XM 100A konzentriert.

[++]Enzymaktivität: 1 µU = 1 pMol Malonyl-CoA/min bei 22°C.

Eine Abtrennung der im Dialysat des 51%-Ammonsulfatsediments enthaltenen Proteaseaktivität war durch Chromatographie an DE 52 nicht zu erreichen. Sowohl der Säulendurchlauf als auch das Eluat, gleich ob durch Stoß-Elution mit 0.25 M K-PO_4 oder durch Gradientenelution von 0.05-0.5 M K-PO_4 erhalten, zeigten eine im Vergleich zum aufgetragenen Material stark erhöhte proteolytische Aktivität, die auch Auswirkungen auf die Haltbarkeit der Enzymfraktionen nach sich zog. So war bei konzentrierten DE-52-Durchlauf- bzw. -Eluatfraktionen eine Abnahme der FAS-Aktivität um rund 50% innerhalb von 24-36 h zu verzeichnen, sofern die Enzymlösungen bei 0°C bzw. +4°C ohne den Zusatz an Proteasehemmstoffen aufbewahrt wurden.

3.6.5. IONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE AN DEAE-SEPHADEX

Im folgenden wurde das Verhalten der C.cohnii-FAS bei Chromatographie an DEAE-Sephadex A25 untersucht. Dabei wurde überprüft, ob sich die bei den DE-52-Säulen beobachtete Aufteilung der FAS-Aktivität (s. 3.6.4.) durch Verwendung dieses alternativen Anionenaustauschers vermeiden ließ. Besonderer Wert wurde auf eine möglichst

vollständige Trennung von FAS- und Proteaseaktivität gelegt.
Der als Ausgangsmaterial dienende 100000xg-Überstand wurde durch Fraktionierung mit 3.8 M $(NH_4)_2SO_4$ in der Kälte und bei Anwesenheit von Proteasehemmstoffen (s. 3.6.3.2.) angereinigt (s. 3.6.2.) oder aber, um eine Aktivierung der endogenen Proteasen durch die Ammoniumsulfatfällung (s. 3.6.3.1.) zu vermeiden, direkt auf den Ionenaustauscher aufgetragen. Falls eine 'Vorreinigung' durch Ammonsulfatfraktionierung erfolgt war, wurde das bei 51% Sättigung erhaltene Proteinpräzipitat entweder in einem großen Volumen an Laufpuffer (Puffer B aus 2.18.1.1., 50 mM Tris-HCl) aufgenommen und sofort auf die nach 2.18.2. vorbereitete Säule gegeben oder aber in einem kleinen Volumen an Puffer B (mit 3 mM EDTA, 2 mM Benzamidin und 1 mM PMSF) resuspendiert und vor dem Säulenauftrag 2 x 2 h lang bei +4°C gegen die jeweils 150-200fache Menge dieses Puffers dialysiert.
Nach dem Aufpumpen der Enzymsuspension wurde so lange mit Puffer B aus 2.18.1.1. nachgewaschen, bis im Säulendurchlauf kein Protein mehr feststellbar war. Das an den Ionenaustauscher gebundene Material wurde anschließend mit einem linearen Gradienten von 0 bis 2 M KCl in Laufpuffer (2 x 300 ml, s. 2.18.1.1. bzw. 2.18.1.3.) eluiert. Ein Beispiel für das Verhalten von FAS- und Proteasen aus dem Sediment der 51%-Ammonsulfatfällung bei der Chromatographie an DEAE-Sephadex A25 zeigt Abb. 3-18. Die benutzte Säule maß 2.2 x 9 cm, aufgetragen wurden 96 mg Protein. Chromatographiert wurde mit einer Durchflußrate von 102 ml/h, wobei in 10-ml-Portionen fraktioniert wurde. Die Fraktionen des Durchlaufs wurden ebenso wie die FAS-Aktivität zeigenden Fraktionen des Eluats (zwischen 0.04 und 0.15 M KCl) vereinigt, jeweils mit flüssigem $(NH_4)_2SO_4$ auf 51% Sättigung gebracht und zentrifugiert. Die Proteinpräzipitate wurden in Laufpuffer (mit 3 mM EDTA, 10 mM DTE und 20% Glycerin) aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Der so gewonnene konzentrierte Säulendurchlauf war eingefroren bis zu 3 Monaten ohne nennenswerten Aktivitätsverlust haltbar. In Eis aufbewahrt betrug der Verlust an Gesamtaktivität 20-30% innerhalb von 7 Tagen.

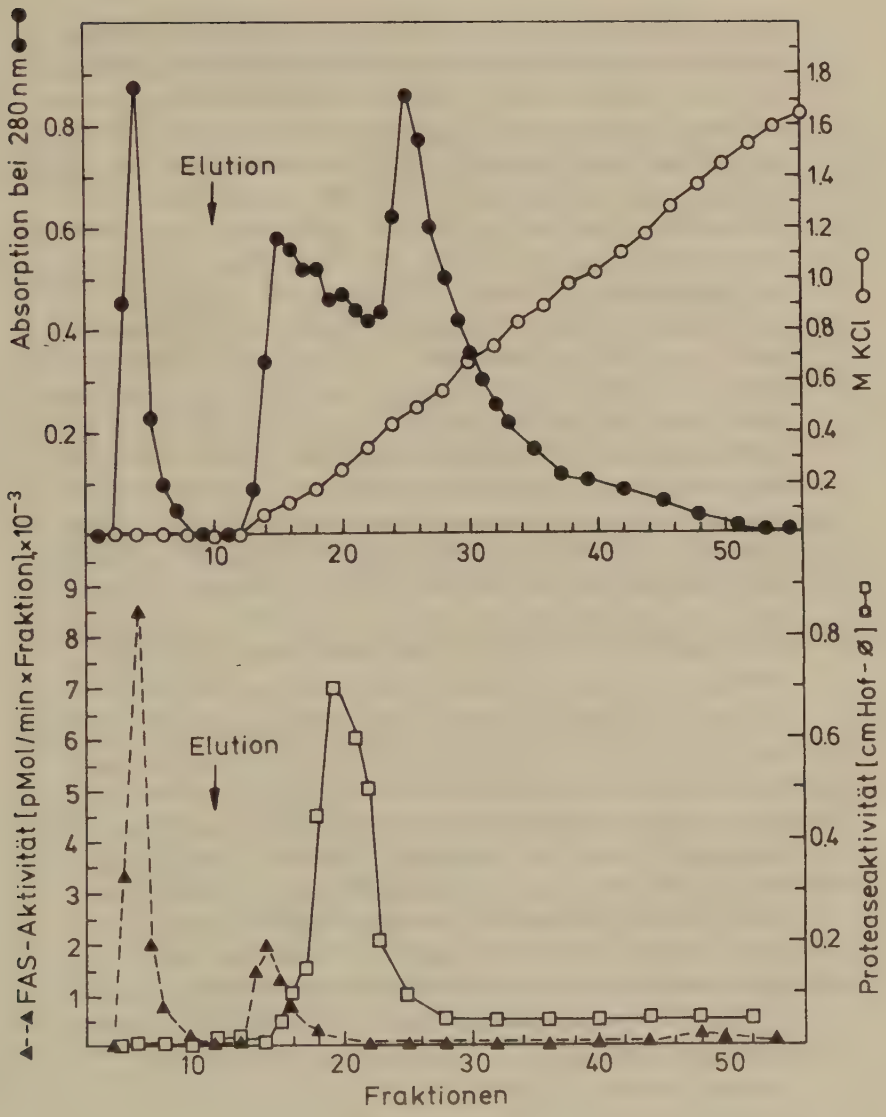


Abb. 3-18: Ionenaustauschchromatographie von C.cohnii-FAS an DEAE-Sephadex A25.

Die Elution erfolgte durch Anlegen eines KCl-Gradienten. Fraktionen à 10 ml wurden gesammelt. Proteaseaktivität: cm Hof-ø/35 µl und 6 h Inkubation bei 22°C.

Im Durchschnitt ließ sich durch Ionenaustauschchromatographie des 51%-Ammonsulfatsediments an DEAE-Sephadex A25 bei einer Ausbeute von 65-80% eine 4-5fache Anreicherung der Fettsäuresynthetase erzielen. Von der wiedergefundenen FAS-Aktivität entfielen auf den konzentrierten Durchlauf stets zwischen 80 und 90%, auf das Eluat (bis 150 mM KCl) zwischen 10 und 20%. Eine Aufspaltung der Enzymaktivität in etwa gleich große Portionen, wie es bei der DE-52-Chromatographie zu beobachten war (s. 3.6.4.), trat hier nicht auf. Ein großer Vorteil der Chromatographie an DEAE-Sephadex war zudem die Abtrennung störender proteolytischer Aktivität bei gleichzeitiger Anreicherung der Fettsäuresynthetase. Der praktisch die Gesamtmenge an wiedergefundener FAS-Aktivität enthaltende Durchlauf des Ionenaustauschers war stets proteasefrei. Unter den angegebenen Bedingungen wurden die Proteasen vollständig an das Gelmaterial gebunden und konnten in einem relativ breiten Gipfel zwischen 0.15 und 0.4 M KCl wieder eluiert werden. Die chromatographische Auftrennung von 100000xg-Überständen ergab ein ähnliches Bild, nur war hier die Anreicherung etwa 2-3mal so hoch bei etwas geringerer Ausbeute (50-65%, s. 3.6.8.).

Der Versuch, durch begrenzte Erhöhung der Ionenstärke des Säulenpuffers (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, mit 20-50 mM KCl, oder 20-50 mM K-PO_4, pH 7.6, anstelle des benutzten Laufpuffers) die FAS vollständig in den Durchlauf zu zwingen, führten zwar in dieser Hinsicht zu einem Teilerfolg (Reduzierung der gebundenen FAS-Aktivität auf $< 5\%$, ergaben jedoch gleichzeitig Säulendurchläufe, die nicht mehr proteasefrei waren. Aus diesem Grund wurde auf die Gewinnung dieser zusätzlichen 5-10% an FAS-Aktivität verzichtet.

Tab. 3-16: Ionenaustauschchromatographie von C.cohnii-FAS an DEAE-Sephadex A25

Enzym-fraktion[+]	Protein (mg)	Spezif. Akt. (µU/mg)[++]	Gesamt-Akt. (µU)	Reinigungs-faktor	Ausbeute (%)
DS 51%	76.0	320.2	24335	1	100
A-25-DL, konz.	13.3	1315	17489	4.1	72
A-25-EL, konz.	8.0	405.4	3243	1.3	13.3

[+]Enzymfraktionen: DS 51% s. Legende zu Tab. 3-14, A25-DL,konz. = durch 51%ige Ammoniumsulfatfällung konzentrierter Säulendurchlauf, A25-EL,konz. = durch Ammonsulfatfällung konzentrierte Fraktionen des zwischen 50 und 150 mM KCl eluierbaren Materials.

[++]Enzymaktivität: 1 µU = 1 pMol Malonyl-CoA umgesetzt/min bei 22°C.

3.6.6. CHROMATOGRAPHIE AN HYDROXYLAPATIT (BIO·GEL HTP)

Adsorption von Fettsäuresynthetasen an Calciumphosphatgel als Verfahren zur partiellen Reinigung der Enzymkomplexe wird in der Literatur häufig beschrieben (LYNEN, 1969; SCHWEIZER et al., 1973; MUESING & PORTER, 1975; NEPOKROEFF et al., 1975; SMITH & ABRAHAM, 1975). Im folgenden wurde daher versucht, ob sich die Hydroxylapatit-Chromatographie für die Isolierung der C.cohnii-FAS verwenden ließ.

Dazu wurden die die Fettsäuresynthetase beinhaltenden Durchlauffraktionen der DEAE-Sephadex-A25-Säulen (s. 3.6.5.) entweder durch Ultrafiltration über AMICON-Membranen (XM 100A oder XM 50) oder durch Ammoniumsulfatfällung (36-51% Sättigung) konzentriert. Proteinpräzipitate wurden vor dem Auftrag auf die BIO·Gel-HTP-Säule in einem großen Volumen an Laufpuffer (20 mM Tris-HCl, s. 2.18.3.1.) resuspendiert. Die Durchführung

der Hydroxylapatit-Chromatographie erfolgte nach 2.18.3.3. Die Benutzung dieses speziellen Calciumphosphat-Gels vor dem Abtrennen der Proteasen durch DEAE-Sephadex-A25 wurde vermieden, da von vielen Proteinasen bekannt ist, daß sie durch Calcium-Ionen aktiviert werden können (s. HARDIE & COHEN, 1978).

Bei dem in Abb. 3-19 wiedergegebenen Beispiel wurde eine Säule mit 2.2 cm Innendurchmesser und 5.2 cm Füllhöhe benutzt. Aufgetragen wurden 67 mg Protein eines konzentrierten DEAE-Sephadex-Durchlaufs. Chromatographiert wurde mit einer Pumpgeschwindigkeit von 32 ml/h. Es wurde so lange mit Laufpuffer (s. 2.18.3.1.) nachgewaschen, bis kein Protein mehr im Durchlauf der Säule festzustellen war. Adsorbiertes Material wurde mit einem Gradienten, bestehend aus je 100 ml Laufpuffer und Elutionspuffer (20 mM Tris-Puffer + 0.5 M Kaliumphosphat-Puffer, s. 2.18.3.3.), eluiert.

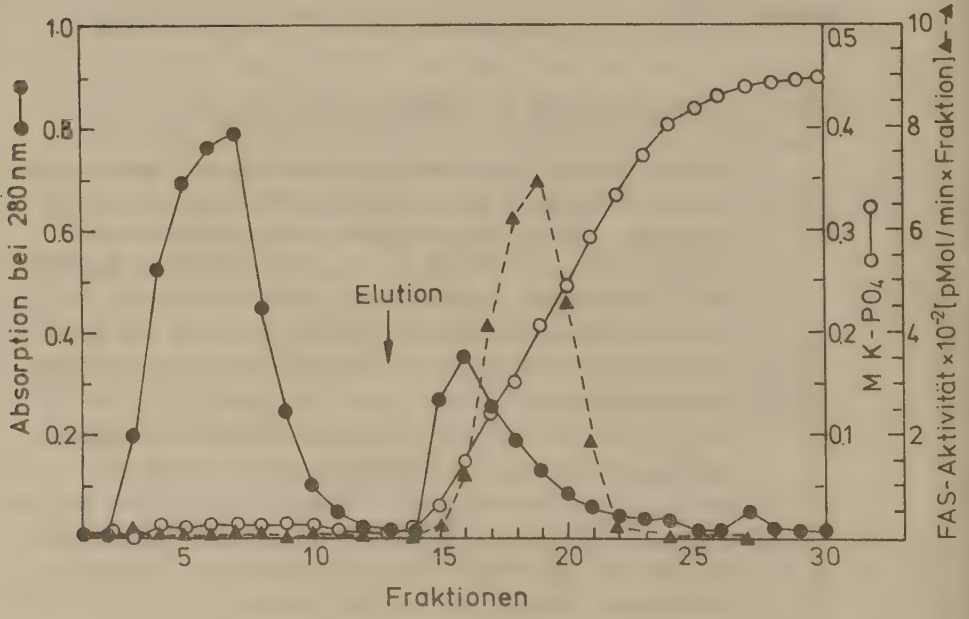


Abb. 3-19: Adsorption von C.cohnii-FAS an Hydroxylapatit (BIO-Gel HTP). Es wurden Fraktionen à 10 ml gesammelt. Weitere Einzelheiten s. Text.

Eine zusammenfassende Übersicht einer Anreicherung der C.cohnii-FAS durch Adsorption an Hydroxylapatit-Gel findet sich in nachfolgender Tabelle:

Tab. 3-17: Anreinigung der C.cohnii-FAS durch Chromatographie an Hydroxylapatit (BIO·Gel HTP)

Enzymfraktion+	Protein (mg)	Spezif.Akt. (mU/mg)	Gesamt-Akt. (μU)	Reinigungsfaktor	Ausbeute (%)
DEAE-A25-DL, konz.	61.5	864	53136	1	100
HA-DL, konz.	8.5	0	0	-	0
HA-EL-I, konz.	11.7	10.2	119	-	2
HA-EL-II, konz.	9.0	3255	29295	3.8	55
HA-EL-III, konz.	6.0	771	4626	1	9

+Enzymfraktionen: DEAE-A25-DL,konz. = durch 51%-Ammonsulfatfällung konzentrierter Durchlauf der DEAE-Sephadex-Säule (s. 3.6.5.); HA-DL = Durchlauf der Hydroxylapatit-Säule; HA-EL-I = Eluat zwischen 0.02 und 0.12 M K-PO_4; HA-EL-II = Eluat zwischen 0.14 und 0.25 M K-PO_4; HA-EL-III = Eluat zwischen 0.26 und 0.4 M K-PO_4. Durchlauf wie Eluate der Hydroxylapatit-Chromatographie wurden vereinigt, durch Fällung mit Ammoniumsulfat (51% Sättigung) konzentriert und in 0.075 M Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM DTE, 3 mM EDTA-Na_2 resuspendiert. Die konzentrierten Proben wurden in 0.1 M KCl und 20% Glycerin bei -20°C aufbewahrt.

Die durch Hydroxylapatit-Chromatographie erzielbare Anreicherung der C.cohnii-FAS aus dem Durchlauf der DEAE-Sephadex-A25-Säule betrug im allgemeinen zwischen 3.5- und 5.5fach. Dabei wurden 50-65% der aufgetragenen Enzymaktivität im 2. Eluat (zwischen 0.12 und 0.28 M Kaliumphosphat) wiedergefunden. Während bis zu einer Konzentration von 0.12 M K-PO_4 zwar 50-70% des gebundenen Proteinmaterials, aber nur 1-2% der wiedergefundenen Enzymaktivität eluierten (s. Abb. 3-19), wurde ein signifikanter Anteil der FAS-Aktivität(zwischen 7 und 18%) erst mit höheren Phosphatkonzentrationen als

0.28 M von der Säule gewaschen. Sämtliche Fraktionen der Hydroxylapatit-Chromatographie waren - auch nach Vereinigung und Konzentrierung durch Ammoniumsulfatfällung (s. Tab. 3-17) - proteasefrei, sofern konzentrierte Durchläufe der DEAE-Sephadex-A25-Säulen als Auftragsmaterial benutzt worden waren. Das die Hauptmenge der wiedergefundenen FAS-Aktivität beinhaltende zweite Eluat der BIO·Gel-HTP-Säulen wurde in der in Tab. 3-17 angegebenen Pufferlösung bei -20°C aufbewahrt und war so mindestens drei Monate lang haltbar, ohne daß ein größerer Aktivitätsverlust feststellbar gewesen wäre.

.6.7. GELFILTRATION ÜBER SEPHAROSE-SÄULEN

Wie für die Reinigung der Fettsäuresynthetase aus S.cerevisiae unter 3.5.4. beschrieben, wurde auch bei der Isolierung der C.cohnii-FAS als letzter Reinigungsschritt eine Gelfiltration des Enzyms vorgenommen. Benutzt wurden dazu Sepharose-6B- bzw. -CL-6B- sowie Sepharose-4B-Säulen mit 1 und 2.5 cm Innendurchmesser bei einer Füllhöhe von 90 oder 95 cm. Die Durchführung der Gelfiltrationen erfolgte nach den unter 2.19. gemachten Angaben. Das Ausschlußvolumen der Säulen (v_o) wurde durch Gelfiltration von Blue Dextran 2000 bestimmt. Die einzelnen Säulen wurden durch Eichung mit Proteinen von bekanntem Molekulargewicht kalibriert. Als Eichproteine dienten dabei: S.cerevisiae-FAS (2.3×10^6 Dalton, gereinigt nach 3.5.), Ferritin (Monomer: 4.5×10^5, Dimer: 9×10^5 Dalton), Catalase (2.4×10^5 Dalton) und Lactat-Dehydrogenase (LDH, 1.4×10^5 Dalton).

Beispiele für die Gelfiltration von C.cohnii - FAS-Fraktionen, die nach 3.6.2. bis 3.6.5. angereinigt worden waren, sind in Abb. 3-20 bzw. 3-21 zusammengestellt. Um durch die partielle Reinigung bedingte Veränderungen des FAS-Säulenprofils, z.B. durch die Aktivierung von Proteasen (s. 3.6.3.1. und 3.6.4.), feststellen zu können, sind zum Vergleich zwei Gelfiltrationen von 100000xg-Überständen (ohne, Abb. 3-20, bzw. mit, Abb. 3-21,

nachweisbarer Proteaseaktivität) mit abgebildet. Für die in den beiden Abbildungen zusammengefaßten Gelfiltrationen wurden Sepharose-CL-6B-Säulen mit den Dimensionen 1 x 95 cm (Abb. 3-20) und 1 x 90 cm (Abb. 3-21) verwendet. Die Durchflußrate betrug jeweils 27.5 ml/h. Die verschiedenen Enzymfraktionen mit Volumina zwischen 4 und 5.5 ml wurden durch Aufpumpen auf die Säule aufgetragen. Als Säulenpuffer dienten: 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, mit 0.1 M KCl, 2 mM DTE und 1 mM EDTA-Na_2 (Abb. 3-20: A-C, Abb. 3-21: A) oder 0.1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.0, mit 2 mM DTE und 1 mM EDTA-Na_2 (Abb. 3-21: B und C). Ein Einfluß des verwendeten Puffers auf das Aktivitätsprofil der Fettsäuresynthetase wurde nicht beobachtet.

Ein typisches Beispiel für die Gelfiltration von C.cohnii-FAS über Sepharose 4B zeigt Abb. 3-22. Als Enzymmaterial dienten die zwischen 0.16 M und 0.25 M K-PO_4 eluierten Fraktionen einer Hydroxylapatit-Säule (s. 3.6.6.), die nach der Vereinigung einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung in den Grenzen von 36 bis 51% Sättigung unterzogen worden waren. Das bei 2.0 M $(NH_4)_2SO_4$ präzipitierte Protein wurde in einem kleinen Volumen an Säulenpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, mit 0.1 M KCl, 2 mM DTE und 2 mM EDTA-Na_2) vorsichtig resuspendiert. Durch Erhöhung der DTE-Konzentrationen auf 5 mM und 30minütige Inkubation der proteasefreien Enzymsuspension bei Raumtemperatur wurde die Fettsäuresynthetase reaktiviert. Anschließend wurde die Proteinlösung auf die nach 2.19. vorbereitete Sepharose-4B-Säule (2.5 cm x 95 cm) aufgepumpt. Die Durchflußrate betrug 27.5 ml/h. Als Vergleich ist in Abb. 3-22 eine mit derselben Säule vorgenommene Gelfiltration eines 100000xg-Überstands gezeigt, der keine nachweisbare Proteaseaktivität enthielt.

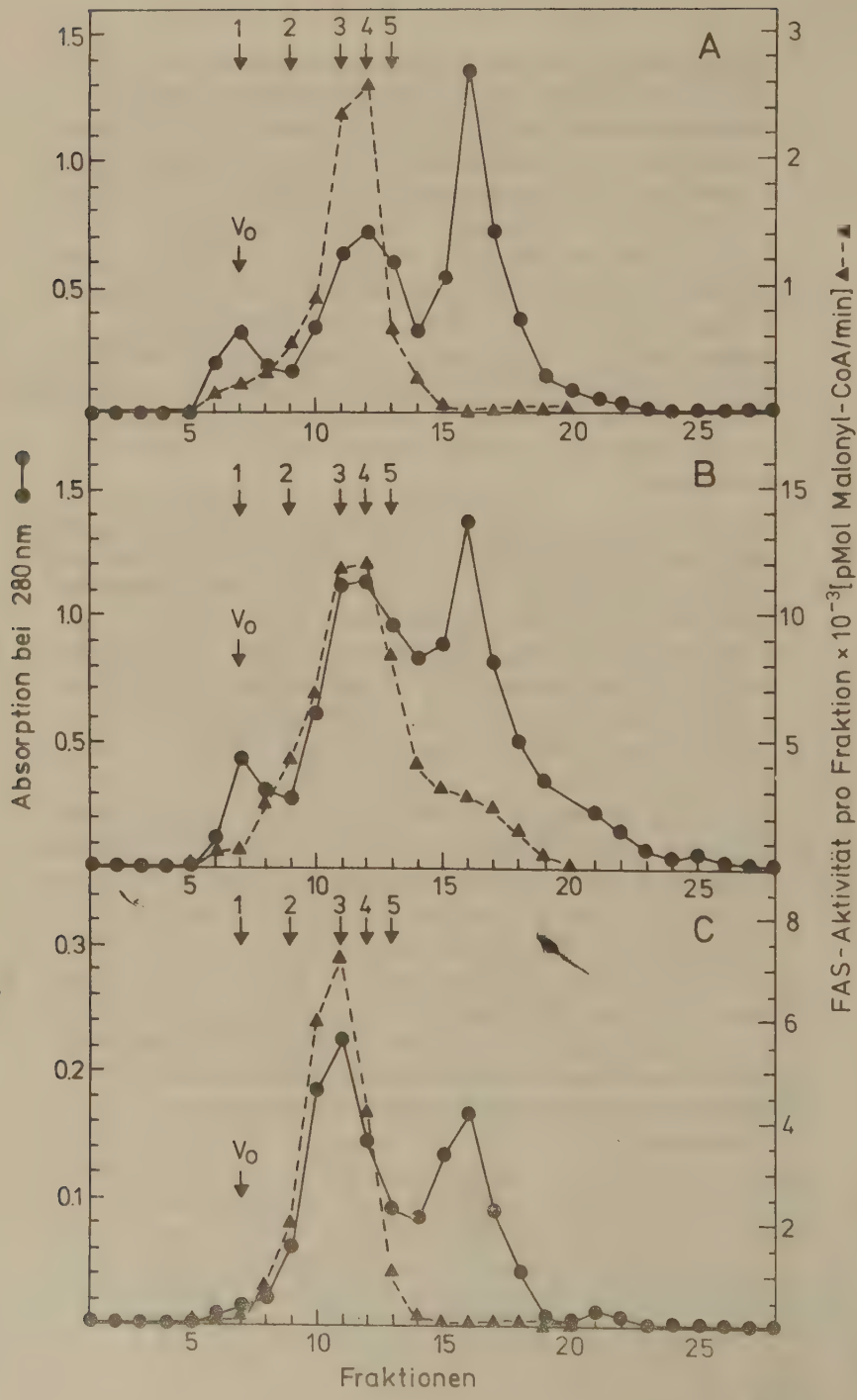

A
B
C
1
2
3
4
5
V_o
Absorption bei 280 nm
FAS-Aktivität pro Fraktion × 10^{-3} [pMol Malonyl-CoA/min]
Fraktionen

Abb. 3-20

Legende zu Abb. 3-20: Sepharose-CL-6B-Gelfiltration von C.cohnii-FAS-Fraktionen.

A: Gelfiltration von 100000xg-Überstand aus spätlogarithmischen Zellen (5-Tage-Kultur). Die Proteinlösung zeigte keine proteolytische Aktivität.
Auftrag: 4 ml mit 58 mg Protein;
FAS-Aktivität: 8236 µU.

B: Gelfiltration von dialysiertem 51%-$(NH_4)_2SO_4$-Sediment.
Auftrag: 5.5 ml mit 126 mg Protein;
FAS-Aktivität: 62424 µU;
Protease-Aktivität: 0.35 cm Hof-Durchmesser pro 230 µg Protein nach 4stündiger Inkubation bei 22°C.

C: Gelfiltration von proteasefreiem DEAE-Sephadex-A25-Durchlauf, konzentriert durch Ammoniumsulfatfraktionierung (36-51% Sättigung).
Auftrag: 4.2 ml mit 13.9 mg Protein;
FAS-Aktivität: 21950 µU.

Benutzt wurde eine Säule mit 1 cm Innendurchmesser und 95 cm Füllhöhe. Es wurden jeweils Fraktionen à 10 ml gesammelt.
Eichproteine: 1 = Hefe-FAS, 2 = Ferritin-Dimer, 3 = Ferritin-Monomer, 4 = Catalase, 5 = LDH. Die eingezeichneten Pfeile deuten auf die Fraktionen, die die größte Menge (oder Enzymaktivität) des betreffenden Eichproteins enthielten.
FAS-Aktivität: 1 µU = diejenige Enzymmenge, die unter den Bedingungen des radioaktiven Tests nach 2.7.8.1. 1 pMol Malonyl-CoA/min umsetzt.
Protease-Aktivität: s. 2.7.6.

Legende zu Abb. 3-21: Sepharose-CL-6B-Gelfiltration von C.cohnii-FAS-Fraktionen.

A: Gelfiltration von 100000xg-Überstand aus stationären Zellen (11-Tage-Kultur).
Auftrag: 4.4 ml mit 77 mg Protein;
FAS-Aktivität: 7630 µU;
Protease-Aktivität: 0.2 cm Hof-ø pro 350 µg Protein nach 6 h Inkubation bei 22°C.

B: Gelfiltration von durch 51%ige Ammonsulfatfällung konzentriertem Durchlauf der DEAE-Cellulose(DE-52)-Chromatographie.
Auftrag: 5 ml mit 29.3 mg Protein;
FAS-Aktivität: 39731 µU;
Protease-Aktivität: 0.75 cm Hof-ø pro 107 µg Protein nach 2 h Inkubation bei 22°C.

C: Gelfiltration von durch 51%ige Ammonsulfatfällung konzentriertem Eluat der DEAE-Cellulose(DE-52)-Chromatographie.
Auftrag: 5.5 ml mit 44.6 mg Protein;
FAS-Aktivität: 58128 µU;
Protease-Aktivität: 0.6 cm Hof-ø pro 81 µg Protein nach 2 h Inkubation bei 22°C.

Die verwendete Säule maß 1 cm x 90 cm. Es wurden Fraktionen à 5 ml (A) bzw. 10 ml (B und C) gesammelt. Weitere Einzelheiten s. Text und Legende zu Abb. 3-20.

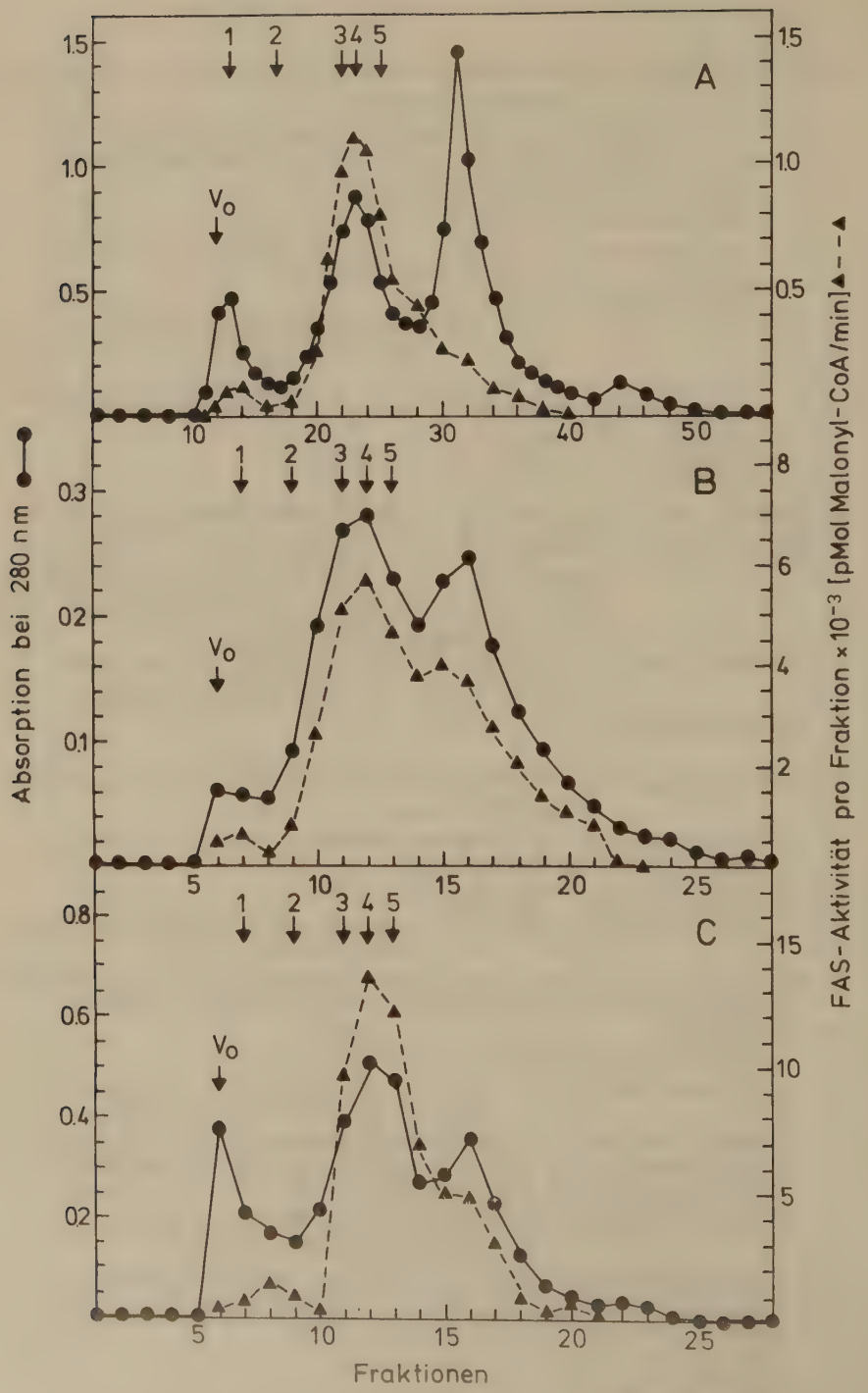

A
B
C
1
2
3
4
5
V_o
Absorption bei 280 nm
FAS-Aktivität pro Fraktion ×10⁻³ [pMol Malonyl-CoA/min]
Fraktionen

Abb. 3-21

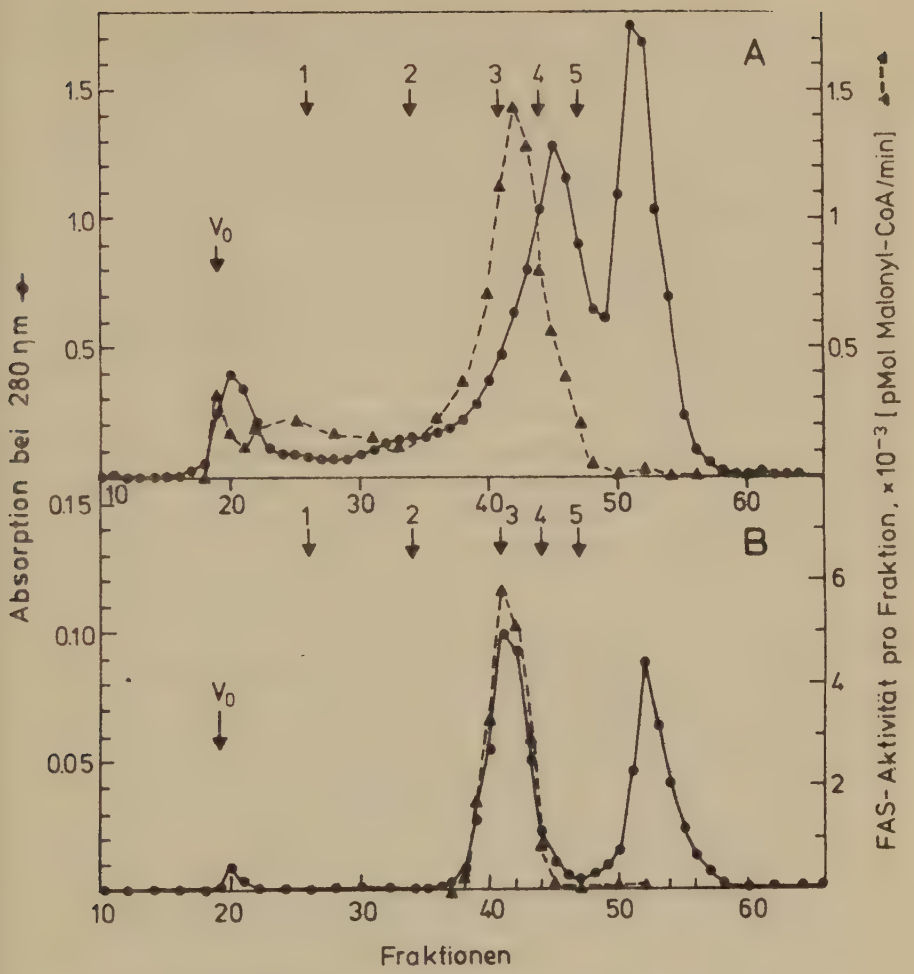


Abb. 3-22: Sepharose-4B-Gelfiltration von C.cohnii-FAS-Fraktionen.

A: Gelfiltration von aus spätlogarithmischen Zellen (5-Tage-Kultur) gewonnenem 100000xg-Überstand (ohne nachweisbare Proteaseaktivität).
Auftrag: 136 mg Protein in 9 ml.
FAS-Aktivität: 12716 µU.

B: Gelfiltration von durch DEAE-Sephadex- und Hydroxylapatit-Chromatographie gereinigter C.cohnii-FAS.
Auftrag: 7.2 mg Protein in 4 ml.
FAS-Aktivität: 23242 µU. Die aufgegebene Enzymsuspension war proteasefrei.

Die verwendete Säule maß 2.5 cm x 95 cm. Es wurden Fraktionen à 10 ml gesammelt. Weitere Einzelheiten s. Text und Legende zu Abb. 3-20.

Bei Gelfiltrationen von 100000xg-Überständen betrug die Anreicherung der Fettsäuresynthetase im allgemeinen zwischen 4-6fach bei Verwendung von Sepharose-6B-Säulen mit 1 cm Innendurchmesser und 6-8fach bei Sepharose-4B-Säulen mit 2.5 cm Durchmesser. Durch Gelfiltration von bereits partiell gereinigtem Enzym (DEAE-Cellulose-, DEAE-Sephadex- oder Hydroxylapatit-Fraktionen) ließ sich zumeist eine 2-4fache Anreicherung erzielen. Bei den verschiedenen Präparationen betrug die Aktivitätsausbeute zwischen 50 und 90% der aufgetragenen Enzymaktivität. Wichtig für die Rückgewinnung eines möglichst hohen Prozentsatzes an FAS-Aktivität sowie für den Erhalt von Fraktionen mit hohen spezifischen Aktivitäten war dabei die Benutzung von Säulenpuffern, die als SH-Schutz mindestens 2 mM DTE enthielten. Der sonst feststellbare Aktivitätsverlust, der sich bei dem relativ langen Verweilen des Enzyms auf den Sepharose-Säulen z.T. auf über 50% belief, konnt zumeist durch Verwendung von 2-3 mM DTE-haltigen Puffern aufgefangen werden.

Die durch die Gelfiltration gewonnenen Fraktionen mit der höchsten Enzymaktivität wurden nach dem Säulenlauf entweder durch Ultrafiltration über AMICON-Membranen (XM 100A oder XM 50) oder durch fraktionierte Fällung mit flüssigem Ammoniumsulfat (36-51% Sättigung) konzentriert. Nach der Ultrafiltration wurden die Proteinlösungen 10 mM an DTE, 3 mM an EDTA und 20%ig an Glycerin gemacht und bei -20°C eingefroren, die durch Ammonsulfatfällung erhaltenen Proteinpräzipitate vorsichtig in 50 mM Tris-HCl, 0.1 M KCl, 10 mM DTE, 3 mM EDTA-Na_2, pH 7.6, resuspendiert und ebenfalls eingefroren. Die gereinigten Enzymsuspensionen waren so aufbewahrt mindestens 3 Monate lang ohne größeren Aktivitätsverlust haltbar. Für Charakterisierungsversuche des Enzyms wurden die in 200-bis 500-µl-Portionen aufbewahrten Proteinlösungen bei +4°C langsam auftauen lassen und vor der FAS-Aktivitätsbestimmung mindestens 30 min lang bei Raumtemperatur vorinkubiert (s. 2.7.8.1.), um einen optimalen enzymatischen Umsatz erzielen zu können.

3.6.8. ZUSAMMENFASSUNG DER ISOLIERUNGSPROZEDUR FÜR DIE FETTSÄURESYNTHETASE AUS C.COHNII

Der letztlich beschrittene Weg zur Reinigung der C.cohnii-FAS beinhaltete nur einen Teil der unter 3.6. aufgeführten Methoden. Wegen der beobachteten Aktivierung der latent in den 100000xg-Überständen vorhandenen Proteasen (s. 3.6.3.1.) wurde auf eine Ammoniumsulfatfraktionierung nach 3.6.2. zu Beginn der Präparation verzichtet und der partikelfreie Überstand der Ultrazentrifugation direkt auf den DEAE-Sephadex-A25-Anionenaustauscher appliziert. Die Chromatographie an diesem Gelmaterial wurde aus den unter 3.6.4. bzw. 3.6.5. genannten Gründen derjenigen an DEAE-Cellulose (DE-52) vorgezogen. Da einige Proteasen bekanntlich durch Ca^{2+}-Ionen aktiviert werden können (s. dazu HARDIE & COHEN, 1978), wurde der Hydroxylapatit-Schritt (s. 3.6.6.) erst nach erfolgter Proteaseabtrennung durch Chromatographie an DEAE-Sephadex-A25 (s. 3.6.5.) verwendet. Als letzter Schritt zur Reindarstellung des Enzyms wurde wie bei der Isolierung der Fettsäuresynthetase aus S.cerevisiae (s. 3.5.4.) eine Gelfiltration an Sepharose 6B bzw. Sepharose 4B nach 3.6.7. durchgeführt. Die in Tab. 3-18 anhand eines Beispiels zusammengefaßte Reinigungsprozedur für die C.cohnii-FAS bestand daher aus nachfolgend aufgelisteten Einzelschritten:

1. Herstellung eines 100000xg-Überstands aus 80-120 g von gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase geernteten Zellen nach 3.6.1.;
2. Ionenaustauschchromatographie des partikelfreien Überstands an DEAE-Sephadex-A25 nach 3.6.5.;
3. Adsorption des proteasefreien Durchlaufs der DEAE-A25-Säule an Hydroxylapatit-Gel nach 3.6.6.;
4. Gelfiltration des Eluats der Hydroxylapatit-Säule an Sepharose 6B oder Sepharose 4B nach 3.6.7.

Tab. 3-18: Beispiel einer Isolierung der C.cohnii-FAS aus dem 100000xg-Überstand anhand o.a. Reinigungsprozedur

Reinigungs-schritt+	Protein (mg)	Spezif.Akt. (μU/mg)++	Gesamt-Akt. (μU)	Reinigungs-faktor	Ausbeute (%)
Ü-100	2825	81.3	229673	1	100
A25-DL, konz.	123	1182	145386	14.5	63.3
HA-EL-II, konz.	25.2	3869	97499	47.6	42.5
Seph. 4B, konz.	6.4	7912	50637	97.3	22.0

+Bezeichnung der Enzymfraktionen: Ü-100 = 100000xg-Überstand, gewonnen aus 95 g spätlogarithmischer C.cohnii-Zellen; A25-DL,konz. = durch Ammoniumsulfatfraktionierung von 36 bis 51% Sättigung konzentrierter, proteasefreier Durchlauf der DEAE-Sephadex-A25-Chromatographie; HA-EL-II,konz. = vereinigte Eluatfraktionen (zwischen 0.145 und 0.265 M Kaliumphosphat-Puffer) der Hydroxylapatit-Säule, konzentriert durch Fällung mit 51% Ammonsulfat; Seph. 4B,konz. = vereinigte FAS-Fraktionen der Sepharose-4B-Gelfiltration, konzentriert durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung in den Grenzen von 36 bis 51% Sättigung.

++FAS-Aktivität: 1 μU = 1 pMol Malonyl-CoA umgesetzt pro min bei 22°C.

Die Anreicherung der C.cohnii- FAS aus dem 100000xg-Überstand betrug bei nach obigem Reinigungsschema durchgeführten Isolierungsversuchen zwischen 79 und 104fach. Die Ausbeuten beliefen sich auf 9-22% der Ausgangsaktivität. Die vereinigten und durch Ammoniumsulfatfraktionierung (s.o.) oder durch Ultrafiltration über AMICON-XM-100A konzentrierten Fraktionen der Gelfiltration zeigten spezifische Aktivitäten zwischen 5700 und 8300 μU/mg Protein.

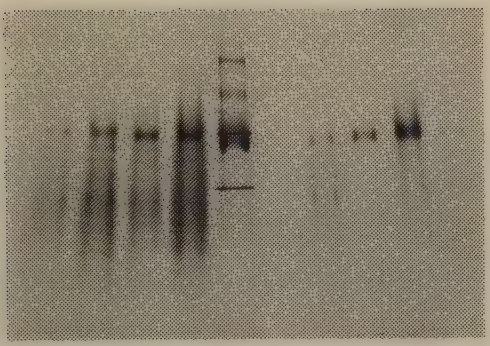


Abb. 3-23,A: Native Gradientengel-Elektrophorese nach 2.10.2. von Enzymfraktionen einer C.cohnii-FAS-Präparation.

Auftrag: 1,2= Ü-100, 450 und 900 µg; 3,4= DS 51%, 215 und 430 µg; 5= Eichproteine (Hefe-FAS, Phosphorylase-Kinase, Ferritin-Dimer und -Monomer, Catalase, LDH; Molekulargewichte s. 3.5.6.); 6= Ausschlußvol. der Seph.-4B-Säule, 42 µg; 7= DEAE-A25-DL, 86 µg; 8-10= FAS-Gipfelfraktion der Seph.-4B-Säule, 90, 180 und 30 µg. Enzymfraktionen: s. Tab. 3-18.

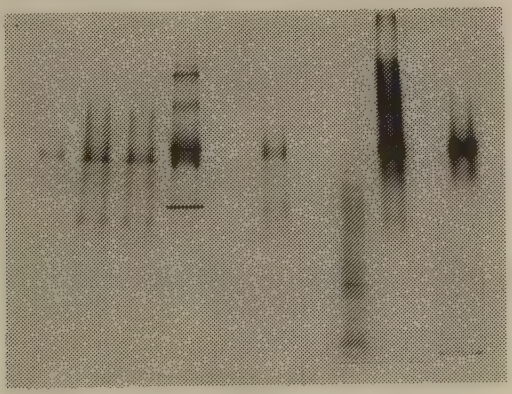


Abb. 3-23,B: Native Gradientengel-Elektrophorese n. 2.10.2. von Enzymfraktionen verschiedener C.cohnii-FAS-Reinigungen.

Auftrag: 1= DEAE-A25-DL, 48 µg; 2,3= DEAE-A25-Eluat, 186 und 93 µg; 4= Eichproteine (s.o.); 5= Ausschlußvol. der Seph.-6B-Säule, 35 µg; 6= HA-EL-II (100-250 mM K-PO_4), 78 µg; 7= HA-EL-I (20-100 mM K-PO_4), 126 µg; 8= HA-EL-II (150-280 mM K-PO_4), 360 µg; 9= FAS-Gipfelfraktion der Seph.-6B-Säule, 250 µg. Bezeichnung der Enzymfraktionen: s. Tab. 3-16 bis 3-18.

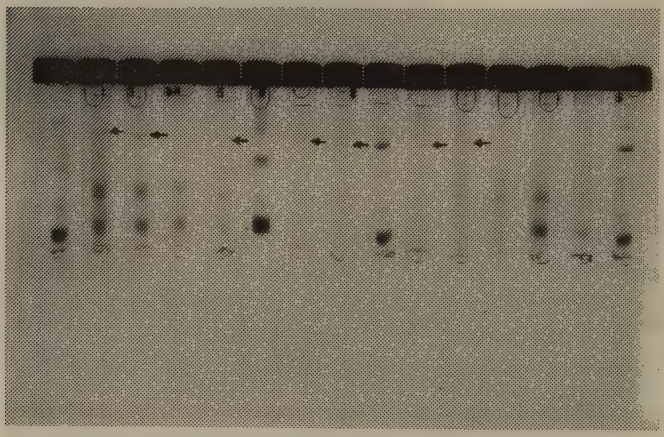


Abb. 3-24,A: SDS/Harnstoff-Gele (6% Acrylamid) von Enzymfraktionen einer C.cohnii-FAS-Präparation.

Auftrag: 1= Eichproteine (Urease, Hefe-FAS, ß-Galactosidase und BSA; Molekulargewichte s. 3.9.6.); 2= Ü-100; 520 µg; 3= DEAE-A25-DL, 231 µg; 4= HA-EL-I (20 - 100 mM K-PO_4), 155 µg; 5= HA-EL-II (150-280 mM K-PO_4), 148 µg; 6= Eichproteine (Urease, Hefe-FAS, RNA-Polymerase, ß-Galactosidase und BSA);
7 und 8 sowie 10-14: Fraktionen der Sepharose-4B-Säule (von links nach rechts geordnet nach abnehmendem Molekulargewicht):
7= Fraktion vor dem FAS-Gipfel, 110 µg; 8= FAS-Gipfelfraktion, 95 µg; Fraktionen nach dem FAS-Gipfel in Reihenfolge der Elution: 10= 126 µg; 11= 138 µg; 12= 140 µg; 13= 144 µg; 14= 140 µg.

Die angegebenen Pfeile weisen auf die Untereinheiten der C.cohnii-FAS hin.

9= Eichproteine (Urease, RNA-Polymerase, ß-Galactosidase und BSA); 15= Eichproteine (Urease, Hefe-FAS, RNA-Polymerase, ß-Galactosidase und BSA).

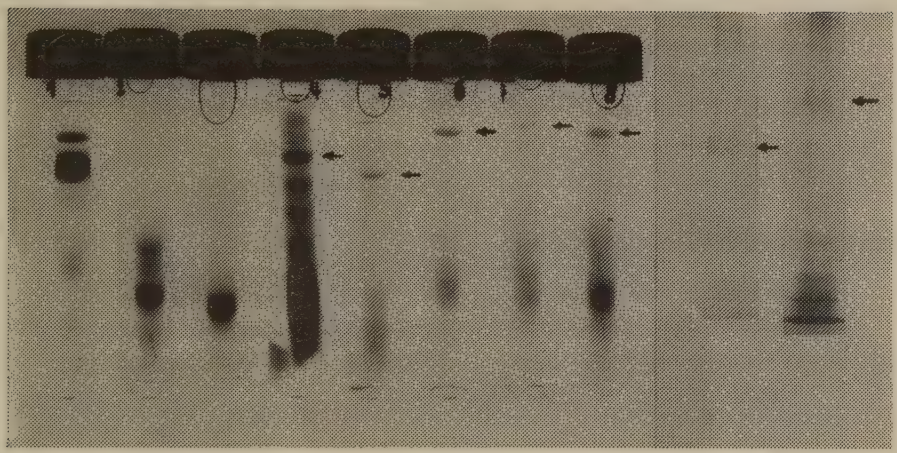


Abb. 3-24,B: SDS- und SDS/Harnstoff-Polyacrylamidgele von verschiedenen Enzymfraktionen diverser C.cohnii-FAS-Präparationen.

Gele 1-8 (von links nach rechts) = SDS/Harnstoff-Gele;
Gele 9 und 10 = SDS-Gele;

Auftrag: 1= Eichproteine (Hefe-FAS und RNA-Polymerase);
2= Ü-100, 900 µg; 3= DS 51%, 630 µg; 4= DS 51%, 1800 µg; 5= HA-EL-II (120-250 mM $K-PO_4$); 6= HA-EL-II (150-280 mM $K-PO_4$); 7= HA-EL-II (100-220 mM $K-PO_4$); In 5-7 jeweils 120 µg Enzymprotein; 8= DEAE-A25-DL, 186 µg;

9= HA-EL-II (140-250 mM $K-PO_4$), 64 µg;
10= DEAE-A25-DL, 112 µg.

Die Pfeile kennzeichnen die Bande der FAS-Untereinheiten.

3.7. EIGENSCHAFTEN DER GEREINIGTEN FETTSÄURESYNTHETASE AUS C.COHNII

Im folgenden sollen die Ergebnisse einiger Versuche zur Charakterisierung des nach 3.6.8. gereinigten Enzyms wiedergegeben werden. Die Durchführung der benutzten radioaktiven FAS-Tests mit (2-^{14}C)-Malonyl-CoA als Substrat erfolgte nach 2.7.8.1.

3.7.1. PROTEINABHÄNGIGKEIT DER FAS-REAKTION

Wie bereits für den 100000xg-Überstand (s. 3.4.1.) beschrieben, wurde auch für das gereinigte Enzym die Abhängigkeit der Menge an de novo synthetisierten langkettigen Fettsäuren von der Menge im Testansatz vorhandenen Enzyms überprüft. Das Ergebnis des Versuchs ist in Abb. 3-25 graphisch dargestellt.

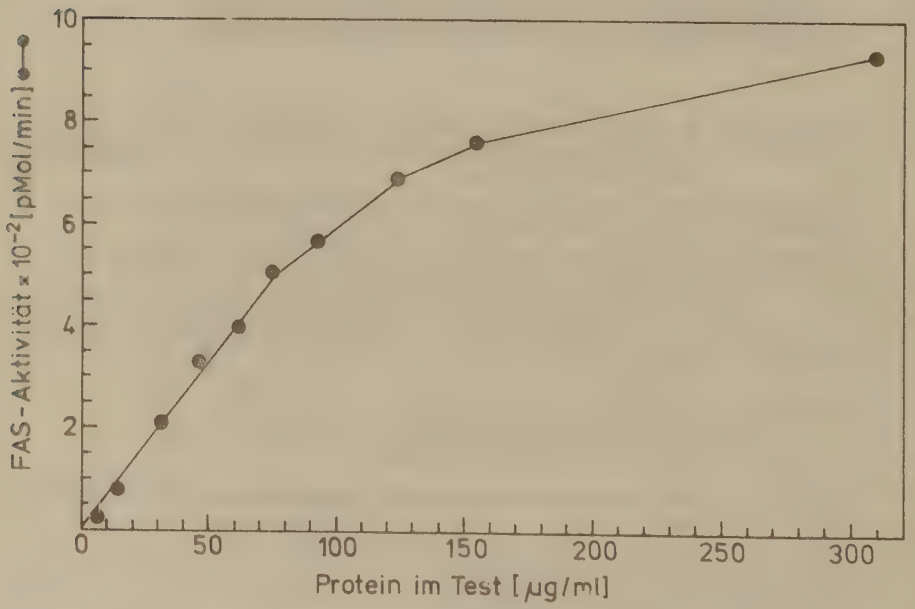


Abb. 3-25: Proteinabhängigkeit der FAS-Reaktion.

Die Menge an neugebildeten Fettsäuren stieg linear an bis zu einer Proteinkonzentration im Test von maximal 75 µg/ml. Höhere Enzymmengen führen zum Abknicken der Kurve und somit zu zu niedrigen Werten für die errechnete spezifische Aktivität der untersuchten Enzymfraktion.

3.7.2. pH-OPTIMUM DER FAS-REAKTION

Die pH-Abhängigkeit der Fettsäurebiosyntheserate wurde im Bereich zwischen pH 7.0 und pH 9.0 untersucht. Dabei wurde bis pH 8.0 in 0.1 M Kaliumphosphat-Puffer, von pH 7.5 bis pH 9.0 in 0.1 M Tris-HCl-Puffer inkubiert. Jeder Testansatz enthielt 65 µg Protein.

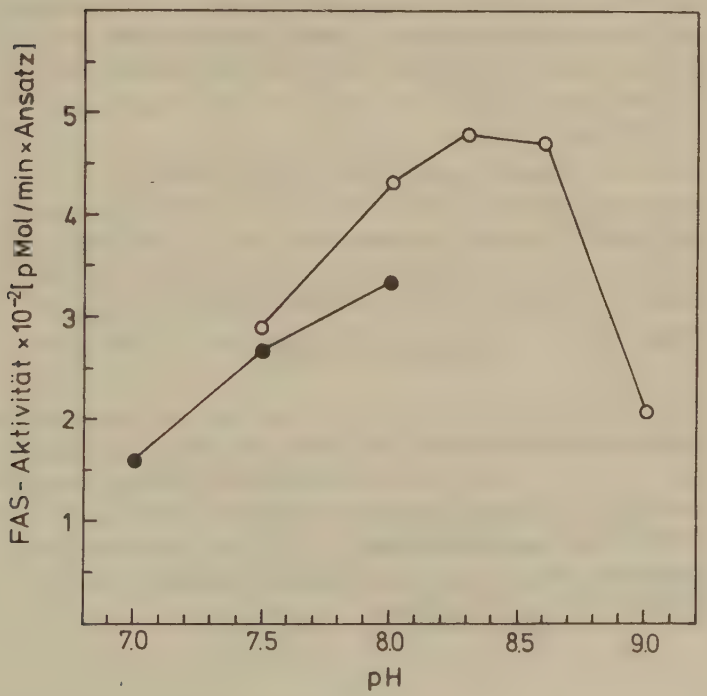


Abb. 3-26: pH-Optimum der FAS-Reaktion.
Inkubation in K-PO_4-Puffer: ●—● ,
Inkubation in Tris-HCl-Puffer: o—o .

Auch bei gereinigtem Enzym lag das Optimum der Reaktion in einem für Fettsäuresynthetasen ungewöhnlich alkalischen pH-Bereich (s. DISKUSSION, Kapitel 4.) zwischen pH 8.0 und 8.6. Die höchste Enzymaktivität wurde bei pH 8.3 erzielt.

3.7.3. COENZYM (NADPH, NADH) - SPEZIFITÄT DER FAS-REAKTION

Im folgenden wurde versucht, durch Variation der im Test vorhandenen Mengen an NADPH bzw. NADH den für die C.cohnii-FAS optimalen Bereich der Coenzym-Konzentration zu bestimmen. Die einzelnen Ansätze enthielten jeweils 21 µg Enzymprotein. Inkubiert wurde entweder mit NADPH oder mit NADH als alleinigem Coenzym für die beiden Reduktionsschritte des FAS-Zyklus. Überprüft wurde die Abhängigkeit der Fettsäurebiosyntheserate von der Menge des im Test vorhandenen Coenzyms im Konzentrationsbereich 1 µM bis 12.5 mM. Das Ergebnis der Versuche ist in Abb. 3-27 wiedergegeben.

Danach ist die Aktivität der C.cohnii-FAS über einen weiten Konzentrationsbereich (0.005-0.25 mM) konstant und ist erst bei einer Konzentration von 3.5 mM NADPH bzw. 2 mM NADH um 50% gehemmt. Die mit NADH als einzigem Reduktionsäquivalent erzielte Fettsäurebiosyntheserate liegt generell unter der mit NADPH erzielbaren (s.a. 3.4.5.).

Die höchste Enzymaktivität war auch bei gereinigter FAS durch eine Kombination von NADPH und NADH zu erzielen (s. 2.7.8.1.). Eine Hemmung der FAS-Aktivität wurde dabei erst mit Konzentrationen von 0.5 mM NADPH + 0.5 mM NADH im Testansatz beobachtet. Für die routinemäßige Enzymbestimmung wurde daher eine Kombination aus 0.2 mM NADPH + 0.2 mM NADH gewählt (s. 2.7.8.1.).

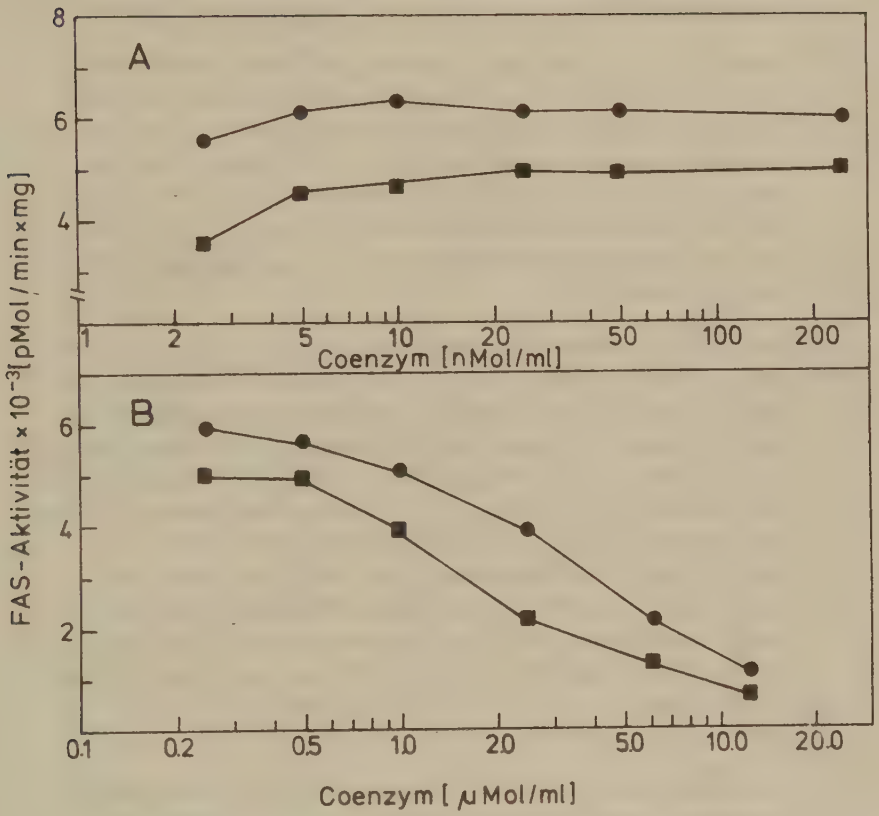


Abb. 3-27: Coenzym-Spezifität von nach 3.6.8. gereinigter C.cohnii-FAS.

A: Abhängigkeit der Fettsäurebiosyntheserate im Konzentrationsbereich 1-200 µM NADPH ●—● bzw. NADH ■—■ .

B: Abhängigkeit der Fettsäurebiosyntheserate im Konzentrationsbereich 0.1-20 mM NADPH ●—● bzw. NADH ■—■ .

3.7.4. SUBSTRAT (MALONYL-, ACETYL-CoA) - SPEZIFITÄT DER FAS-REAKTION

Durch Variation der dem Inkubationsansatz zugesetzten Menge an Malonyl- bzw. Acetyl-CoA wurde versucht, den für eine optimale FAS-Aktivität erforderlichen Konzentrationsbereich beider Substrate festzulegen. Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der im Test vorhandenen Malonyl-CoA-Konzentration ist in Abb. 3-28,A, die von der Acetyl-CoA-Konzentration in Abb. 3-28,B graphisch dargestellt.

Wie man der Abbildung entnehmen kann, ist die FAS-Aktivität im Bereich von 25 bis 500 µM Malonyl-CoA bei 50 µM Acetyl-CoA im Test konstant. Erst eine Reduzierung der Substratmenge auf unter 25 µM sowie eine Erhöhung auf 1 mM führt zu einer deutlichen Hemmung des enzymatischen Umsatzes (s. Abb. 3-28,A). Der günstigste Konzentrationsbereich für Acetyl-CoA liegt demgegenüber zwischen 25 und 100 µM bei Vorhandensein von 100 µM Malonyl-CoA pro Ansatz. Die Reduzierung der Fettsäurebiosyntheserate bei höheren Acetyl-CoA-Konzentrationen ist hier deutlicher ausgeprägt als beim Malonyl-CoA (Abb. 3-28,B: 30%ige Hemmung bei 0.5 mM, 70%ige Hemmung bei 1 mM Acetyl-CoA im Test).

In Abwesenheit des als Startermolekül für die FAS-Reaktion dienenden Acetyl-Coenzym A war die Fettsäurebiosyntheserate bei einer Malonyl-CoA-Konzentration von 150 µM im Test um rund 80% reduziert. Das Ausmaß des enzymatischen Umsatzes der Fettsäuresynthetasen sowie das Fettsäuremuster der Reaktionsprodukte hängt allerdings nicht nur von der Menge der den Inkubationsansätzen zugegebenen Substrate ab, sondern auch vom Verhältnis beider Substrate zueinander (SUMPER et al., 1969; CAREY & DILS, 1970; HOLTERMÜLLER et al., 1970; KHAN & KOLATTUKUDY, 1973; SMITH & ABRAHAM, 1975). Dieses gilt, wie in Abb. 3-29 und Tab. 3-19 gezeigt wird, auch für die C.cohnii-FAS. Bei einem Überschuß von Acetyl-CoA ist die Fettsäurebiosynthese deutlich gehemmt, während sie bei einem Verhältnis von Malonyl- zu Acetyl-CoA zwischen 2:1 und 10:1 nahezu konstant bleibt.

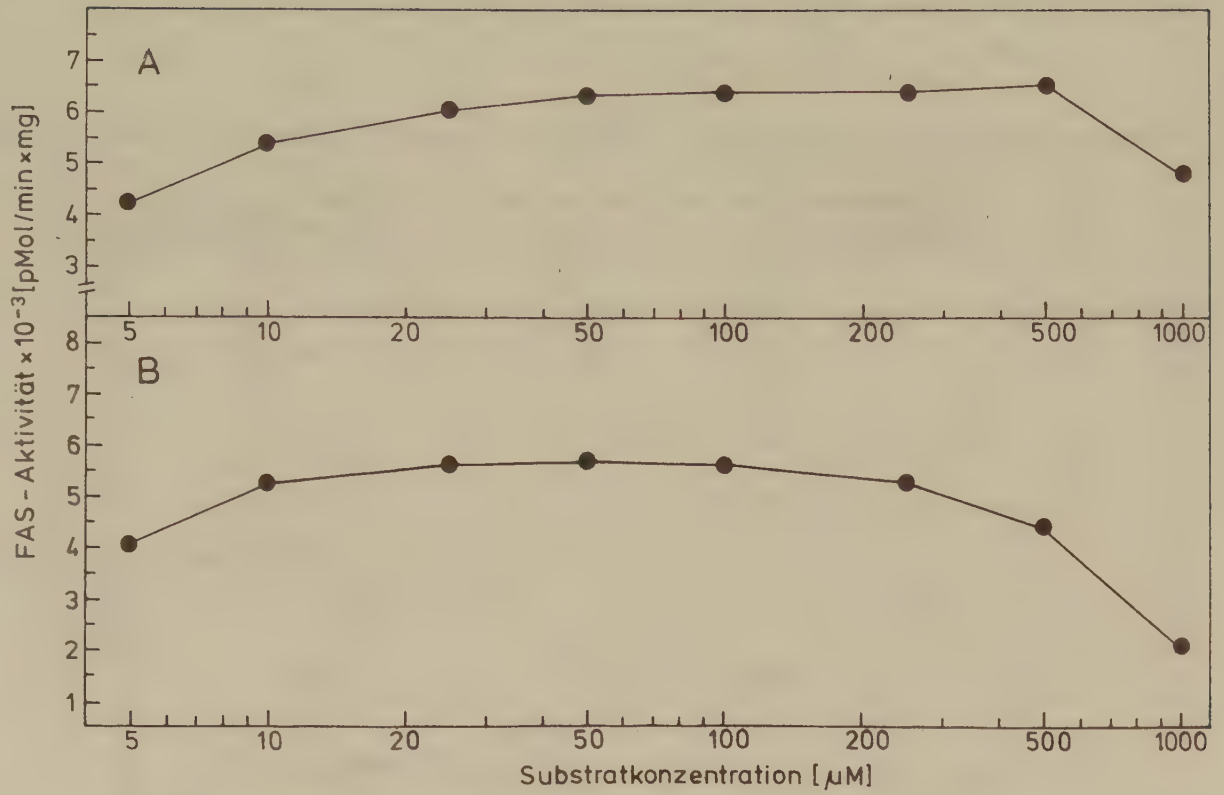


Abb. 3-28: Abhängigkeit der FAS-Aktivität von der Substratkonzentration
A: Abhängigkeit der Fettsäurebiosyntheserate von der im Testansatz vorhandenen Menge an Malonyl-CoA im Bereich von 5-1000 nMol/ml; Acetyl-CoA-Konzentration: konstant 50 µM;
B: Abhängigkeit der Fettsäurebiosyntheserate von der im Testansatz vorhandenen Menge an Acetyl-CoA im Bereich von 5-1000 nMol/ml; Malonyl-CoA-Konzentration: konstant 100 µM.
Jeder Testansatz enthielt 40 µg Enzymprotein.

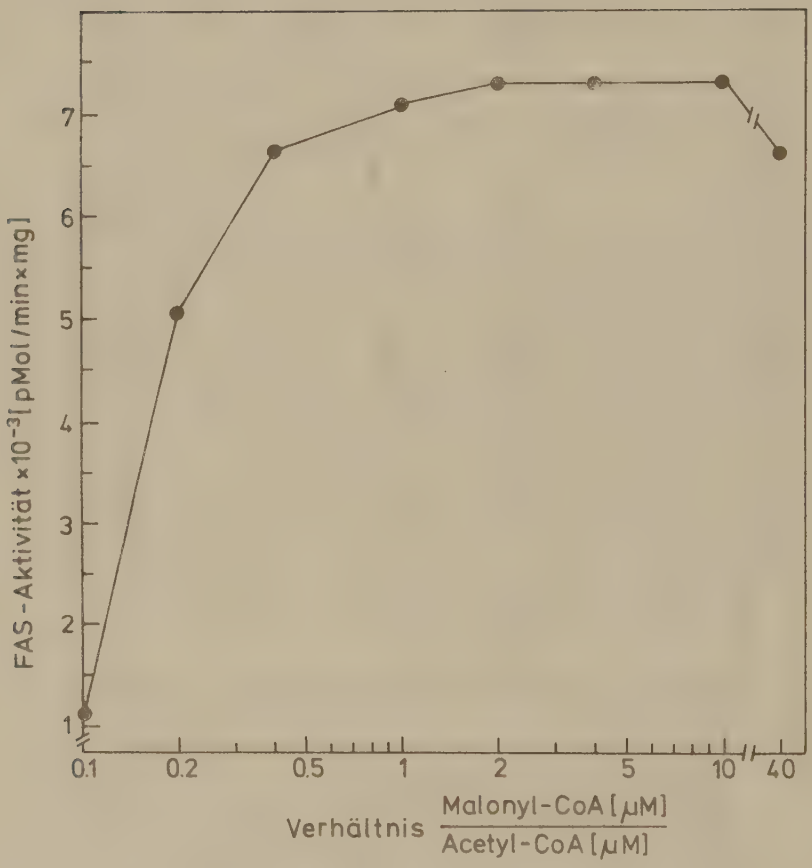


Abb. 3-29: Spezifische Aktivität der C.cohnii-FAS in Abhängigkeit vom Malonyl-/Acetyl-CoA-Verhältnis.

Jeder Testansatz enthielt 61 µg Protein.

Tab. 3-19: Verschiebung des Fettsäuremusters durch hohes Acetyl- zu Malonyl-CoA-Verhältnis

Ansatz[+]	Verhältnis Malonyl-CoA / Acetyl-CoA	Muster der ^{14}C-markierten FAS-Reaktionsprodukte (Anteil an insgesamt in die FSME inkorporierten Radioaktivität in %)						
		$C_{10:0}$-ME	$C_{12:0}$-ME	$C_{14:0}$-ME	$C_{16:0}$-ME	$C_{18:0}$-ME	$C_{20:0}$-ME	$C_{22:0}$-ME
A	2:1	-	1	12	44	25	5	13
B	0.2:1	7	14	23	32	16	2	6

[+]Ansätze: A = Standardansatz, s. 2.7.8.1.,
B = Ansatz mit 150 µM Acetyl-CoA.

Für die routinemäßige Bestimmung der Enzymaktivität (siehe 2.7.8.1.) enthielten die Inkubationsansätze daher 150 µM Malonyl-CoA und 75 µM Acetyl-CoA (Verhältnis 2:1).

3.7.5. FETTSÄUREMUSTER DER FAS-REAKTIONSPRODUKTE

Hauptsächliches Reaktionsprodukt des Fettsäurebiosynthesezyklus im C.cohnii-100000xg-Überstand waren freie Fettsäuren (80% der radioaktiv markierten langkettigen Fettsäuren waren direkt mit n-Pentan extrahierbar, s. 3.4.6.). Die Analyse der vom gereinigten Enzym synthetisierten Fettsäuren nach der Methode von BUCKNER & KOLATTUKUDY (1976), s.a. 3.4.6., ergab keinen signifikanten Einbau von (2-^{14}C)-Malonyl-CoA in die Acyl-CoA-Ester-Fraktion. Freie Fettsäuren waren hier alleiniges Reaktionsprodukt.

Die Ermittlung des Fettsäuremusters der FAS-Reaktionsprodukte erfolgte mittels Radiogaschromatographie wie in 3.4.7. beschrieben. Die Menge an radioaktivem Einbau in die individuellen Fettsäuremethylester ist in Tab. 3-20 zusammengefaßt.

Wie man aus der Tabelle ersehen kann, ist Palmitinsäure das Hauptreaktionsprodukt bei 75 µg Enzymprotein im Test (=42%). Bei mehr als doppelter Proteinkonzentration im Ansatz (200 µg, Ansatz B) läßt sich eine leichte Verschiebung der radioaktiven Markierung hin zum längerkettigen Bereich des Fettsäurespektrums beobachten. Hier ist der Anteil an ^{14}C-Markierung in $C_{18:0}$, $C_{20:0}$ und $C_{22:0}$ z.T. deutlich erhöht, während der Einbau in $C_{14:0}$ und $C_{16:0}$ reduziert ist. Radioaktiver Einbau von (2-^{14}C)-Malonyl-Resten in Fettsäuren mit einer kürzeren Kettenlänge als $C_{12:0}$ wurde bei der Analyse von Reaktionsprodukten der gereinigten C.cohnii-FAS in keinem der untersuchten Fälle beobachtet, ebensowenig wie ^{14}C-Markierung von $C_{22:6}$ oder $C_{18:1}$.

Tab. 3-20: Analyse der Kettenlänge der von gereinigter C.cohnii-FAS synthetisierten Fettsäuren

FSME[+]	Radioaktiver Einbau (cpm)		Anteil an Gesamt-FSME (%)	
	A^{++}	B^{++}	A^{++}	B^{++}
$C_{14:0}$-ME	954	919	13	7
$C_{16:0}$-ME	3088	4206	42	31
$C_{18:0}$-ME	2051	4564	28	34
$C_{20:0}$-ME	455	1056	6	8
$C_{22:0}$-ME	799	2708	11	20

[+] FSME = Fettsäuremethylester, $C_{14:0}$-ME = Myristinsäuremethylester;

[++] Ansätze: A = 75 µg Protein, B = 200 µg Protein im Test;

Beide Ansätze wurden jeweils 30 min lang inkubiert. Gesamt-FSME (100%): 7347 cpm bei Ansatz A, 13453 cpm bei Ansatz B. Die gereinigte C.cohnii-FAS besaß eine spezifische Aktivität von 7342 pMol/min x mg (= 7342 µU).

3.8. VERSUCHE ZUR STEIGERUNG DER ENZYMAKTIVITÄT DER GEREINIGTEN FETTSÄURESYNTHETASE AUS C.COHNII

Da die Fettsäuresynthetase aus C.cohnii einen im Vergleich zu anderen untersuchten Multienzymkomplexen äußerst geringen enzymatischen Umsatz zeigte (s.a. DISKUSSION, Kapitel 4.), wurde im folgenden untersucht, auf welche Weise eine Aktivitätssteigerung des Enzyms zu erreichen war. Bis auf die in den nächsten Abschnitten angegebenen Variationen der Inkubationsbedingungen erfolgten die FAS-Tests nach 2.7.8.1.

3.8.1. AKTIVIERUNG DER C.COHNII-FAS DURCH VORINKUBATION DES ENZYMS BEI RAUMTEMPERATUR

Die bei -20°C aufbewahrte Enzymprobe wurde bei +4°C aufgetaut und anschließend in Eis überführt. Die einzelnen Ansätze wurden nach 2.7.8.1. in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.3, 5 mM DTE, 2 mM EDTA-Na_2, 0.3 mg/ml BSA und 0.1 M KCl verschieden lange vorinkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von NADPH, NADH, Acetyl- und Malonyl-CoA gestartet wurde. Die Abhängigkeit der erzielten spezifischen Aktivität von der Dauer der Vorinkubation ist in Abb. 3-30 graphisch dargestellt.

Da durch o.a.Vorinkubation des Enzyms eine deutliche Aktivitätssteigerung zu verzeichnen war, wurde für routinemäßige Bestimmungen der FAS-Aktivität eine Vorinkubationszeit von 30 min gewählt.

3.8.2. EINFLUSS VON DTE AUF DIE FAS-AKTIVITÄT

Die Notwendigkeit der Zugabe von SH-Schutzsubstanzen zum Test wurde bereits für den 100000xg-Überstand vermerkt (s. 3.4.4., Abb. 3-6). Im folgenden wurde der Einfluß von steigenden Mengen an DTE auf die Aktivität der C.cohnii-FAS näher untersucht. Die verwendete Enzymprobe wurde bei +4°C aufgetaut und dann in Eis überführt. Die einzelnen Enzymtests wurden nicht vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gereinigter C.cohnii-FAS

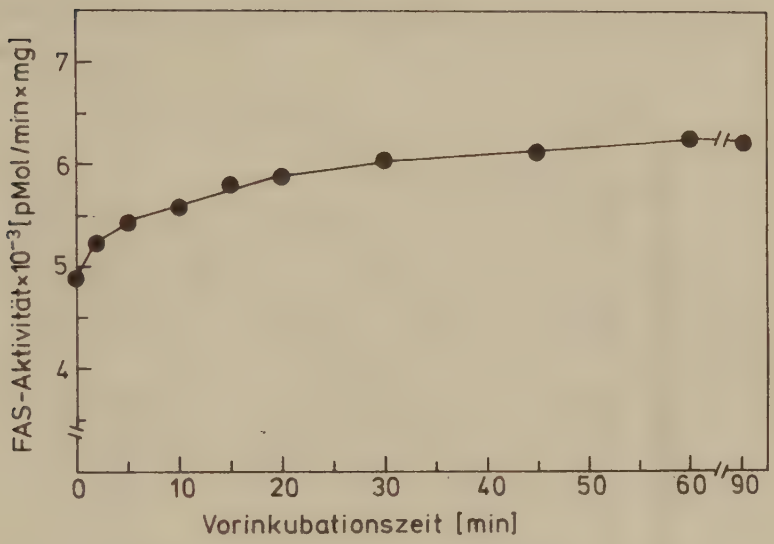


Abb. 3-30: Aktivierung der C.cohnii-FAS durch Vorinkubation

zum kompletten Inkubationsansatz gestartet. Das Ergebnis des Versuchs ist in Abb. 3-31 dargestellt.

Für routinemäßige Bestimmungen der FAS-Aktivität wurde eine DTE-Konzentration von 5 mM gewählt. Höhere DTE-Konzentrationen bewirken zwar eine weitere Steigerung der Enzymaktivität, führen aber gleichzeitig zu einer starken Erhöhung der aus Kontrollansätzen (ohne Enzym) extrahierbaren Radioaktivität.

3.8.3. EINFLUSS DER IONENSTÄRKE DES PUFFERS AUF DIE FAS-AKTIVITÄT

Die Beeinflussung der FAS-Aktivität durch die Ionenstärke des Inkubationspuffers ist vielfach dokumentiert (HSU et al., 1965; YANG et al., 1967; BRINDLEY et al., 1969; KNOCHE & KOTHS, 1973; VANCE et al., 1973; KAWAGUCHI & OKUDA, 1977).

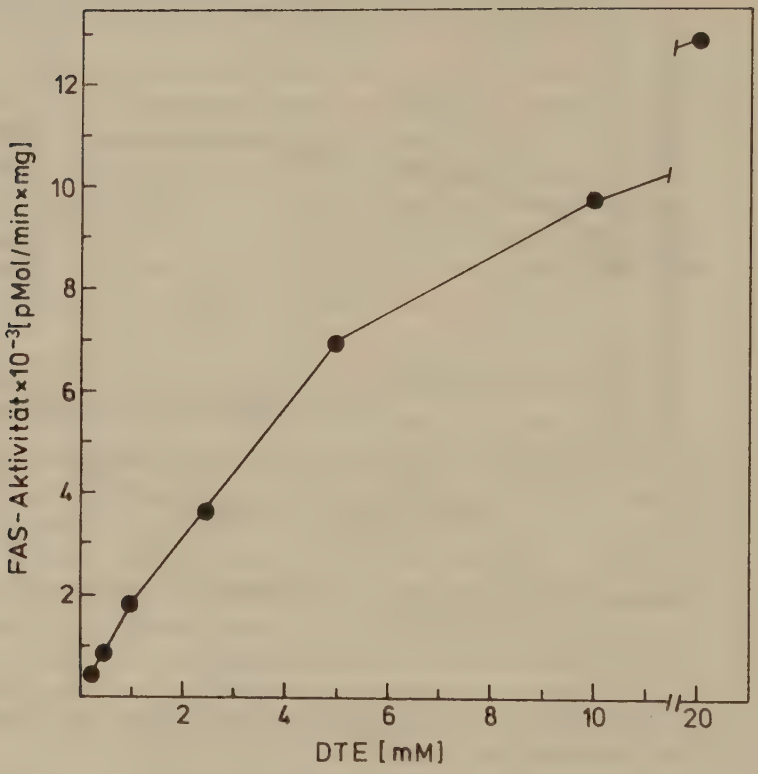


Abb. 3-31: Einfluß von steigenden DTE-Konzentrationen im Test auf die Aktivität der C.cohnii-FAS.

Aus diesem Grund wurde die Malonyl-CoA-Einbaurate der gereinigten FAS aus C.cohnii in Abhängigkeit von steigenden Konzentrationen an Kaliumphosphatpuffer, pH 7.6, untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 3-32 wiedergegeben. Inkubiert wurde im Bereich zwischen 0.01 und 0.4 M $K\text{-}PO_4$.

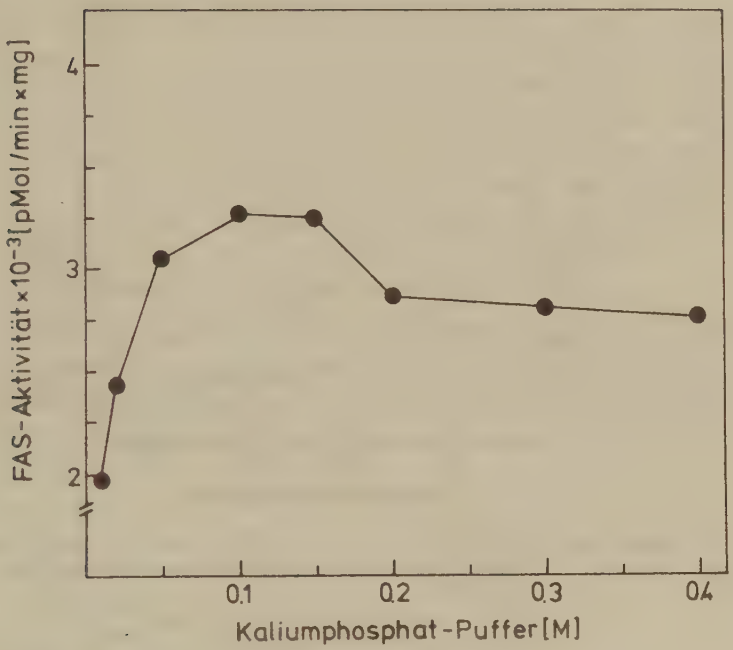


Abb. 3-32: Einfluß der Ionenstärke des Puffers auf die Aktivität der C.cohnii-FAS.

3.8.4. BEEINFLUSSUNG DER FAS-AKTIVITÄT DURCH KALIUM- UND NATRIUMCHLORID

Im folgenden wurde die Aktivität der C.cohnii-FAS in Abhängigkeit von steigenden Mengen an KCl bzw. NaCl im Testansatz bestimmt. Die Inkubationen erfolgten nach 2.7.8.1. in 0.1 M Tris-HCl-Puffer, pH 8.3. Es wurde wie unter 3.8.1. angegeben vorinkubiert unter Zusatz der verschiedenen Mengen an 2.0 M KCl- bzw. NaCl-Lösung wie in Abb. 3-33 aufgeführt.

Gegenüber dem Kontrollwert (ohne Salzzusatz) ließ sich durch Vorhandensein von 50 mM NaCl und 100 mM KCl eine deutliche Zunahme der FAS-Aktivität feststellen. Höhere

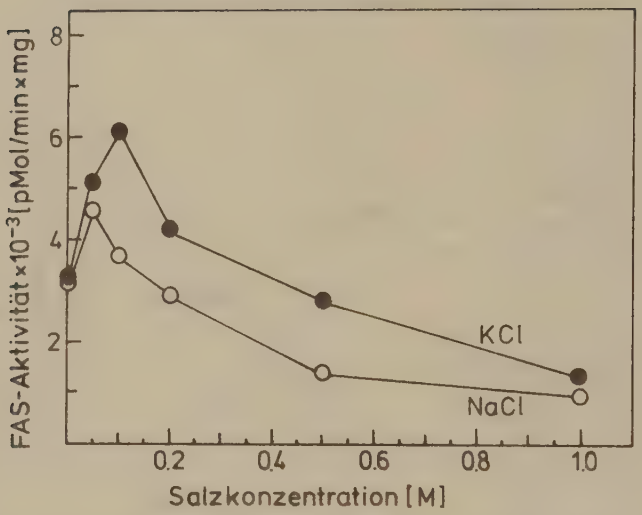


Abb. 3-33: Einfluß von KCl und NaCl auf die Aktivität der gereinigten Fettsäuresynthetase aus C.cohnii.

KCl-Konzentrationskurve: ●—●
NaCl-Konzentrationskurve: ○—○
Beide Salze waren in den jeweils angegebenen Konzentrationen bereits während der 30minütigen Vorinkubationsdauer anwesend.

Konzentrationen der beiden Salze im Inkubationsansatz führten jedoch zur Hemmung des enzymatischen Umsatzes auf Werte, die unter der ohne Salzzugabe erreichbaren Aktivität lagen. Im direkten Vergleich ließ sich mit KCl eine größere Aktivitätssteigerung (Maximum bei 100 mM) als mit NaCl (Maximum bei 50 mM) erzielen.
Für routinemäßige Bestimmungen der C.cohnii-FAS-Aktivität wurde den einzelnen Ansätzen daher 50 µl 2 M KCl/ml Test zugegeben (Endkonzentration im Test: 0.1 M). Die für die Aufbewahrung von während der Enzymreinigung anfallenden Proteinlösungen benutzten Pufferlösungen enthielten ebenfalls 0.1 M KCl.

3.8.5. BEEINFLUSSUNG DER FAS-AKTIVITÄT DURCH FMN

Für die Fettsäuresynthetase-Komplexe aus einigen höheren Prokaryonten wie Streptomyces erythreus (ROSSI & CORCORAN, 1973), Corynebacterium diphtheriae (KNOCHE & KOTHS, 1973) und Mycobacterium smegmatis (früher: M.phlei, VANCE et al., 1973) sowie für die Enzymsysteme aus niederen Eukaryonten wie S.cerevisiae (LYNEN, 1969) und etiolierten Euglena gracilis-Zellen (GOLDBERG & BLOCH, 1972) wurde die Anwesenheit von FMN im Enzymkomplex bzw. die Notwendigkeit von FMN-Zusatz zum FAS-Test nachgewiesen.

Im folgenden wurde versucht, die Aktivität der Fettsäuresynthetase aus C.cohnii durch Zugabe von steigenden Mengen an FMN zu steigern. Das Ergebnis der Inkubationsversuche zeigt Abb. 3-34.

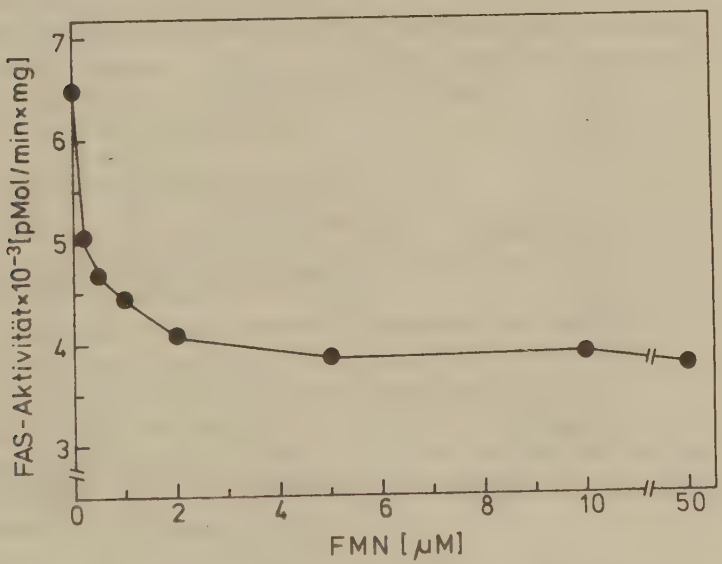


Abb. 3-34: Hemmung der C.cohnii-FAS-Aktivität durch FMN.

Wie man obiger Abbildung entnehmen kann, war durch FMN-Zusatz keine Aktivitätssteigerung zu erzielen. Die Anwesenheit von FMN im Inkubationsmedium resultierte stattdessen in einer Hemmung des enzymatischen Umsatzes.

3.8.6. EINFLUSS VON FREIEM CoASH AUF DIE AKTIVITÄT DER C.COHNII-FAS

Eine Hemmung der FAS-Aktivität durch Vorhandensein von freiem Coenzym A im Enzymtest wurde für mehrere Fettsäuresynthetasen beschrieben (HSU et al., 1965; KHAN & KOLATTUKUDY, 1973; GIOMPRES & PACKTER, 1978). Andererseits wird in einer neueren Arbeit (LINN et al., 1980) die Möglichkeit diskutiert, daß freies CoASH für die Aktivität der Fettsäuresynthetase aus Rattenleber essentiell sein könnte. Aus diesen Gründen wurde anhand nachfolgend beschriebenen Experiments die Aktivität der C.cohnii-FAS bei Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen an freiem Coenzym A im Testansatz untersucht. Das Ergebnis zeigt Abb. 3-35.

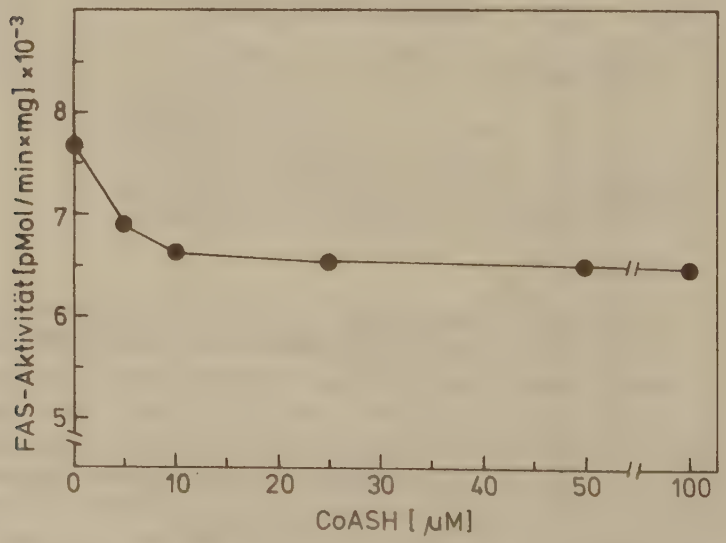


Abb. 3-35: Hemmung der C.cohnii-FAS-Aktivität durch CoASH.

Wie die Abbildung zeigt, sinkt die FAS-Aktivität bis zu einer CoASH-Konzentration von 10 nMol/ml Testvolumen um rund 14%, weitere Erhöhung der Coenzym-A-Konzentration bis auf 0.1 mM ergibt nur noch eine geringe weitere Hem-

mung der Enzymaktivität auf insgesamt 17%. Eine Steigerung der FAS-Aktivität durch die Zugabe von CoASH wurde nicht beobachtet. Das Ausmaß der Hemmung durch freies CoASH ist allerdings nicht so stark ausgeprägt wie bei anderen Fettsäuresynthetasen (s. DISKUSSION, Kapitel 4.).

3.8.7. BEEINFLUSSUNG DER C.COHNII-FAS-AKTIVITÄT DURCH ANDERE EXOGEN ZUGESETZTE CHEMISCHE FAKTOREN UND PHYSIKALISCHE PARAMETER

1. Serumalbumin und EDTA-Na_2:

BSA- wie EDTA-Zusatz resultierten nur in einer geringfügigen Steigerung des enzymatischen Umsatzes bei gereinigter (s. 3.6.8.) C.cohnii-FAS (um 5%) und zeigten unter den in 2.7.8.1. verwendeten Konzentrationen (0.3 mg/ml BSA und 2 mM EDTA-Na_2) keinerlei hemmende Wirkung. Beide Substanzen wurden dem Inkubationsmedium aus Gründen des Schutzes der Fettsäuresynthetase vor proteolytischem Angriff zugesetzt.

2. E.coli-Acyl-Carrier-Protein (ACP):

Zugabe von E.coli-ACP (10-200 µg/ml Test) führte bei Vorhandensein von 5 mM DTE im Inkubationsansatz sowohl beim 100000xg-Überstand-Enzym als auch bei gereinigter FAS zu keiner signifikanten Steigerung der (2-^{14}C)-Malonyl-CoA-Inkorporation in langkettige Fettsäuren. Eine Steigerung der Enzymaktivität konnte nur bei 1 und 2 mM DTE im Test (suboptimale Konzentrationen) beobachtet werden (30-40%) und dürfte so eher auf einen "SH-Effekt" als auf Bedürftigkeit der Fettsäurebiosynthese für ACP hindeuten.

3. Physikalische Parameter (Erhöhung der Inkubationstemperatur und vorsichtiges Schütteln der Ansätze im temperierten Wasserbad):

Durch Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 30 bzw. 37°C wurde die Malonyl-CoA-Einbaurate reduziert (um 10-20% bei 30°C bzw. um 40-60% bei 37°C). Bei 25°C im Photometer anhand des NAD(P)H-Verbrauchs gemessene

Enzymaktivitäten entsprachen dagegen den bei 22°C mit Hilfe des radioaktiven FAS-Tests bestimmten (s. 2.7.8.1. und 2.7.8.2.). Inkubationen bei tieferen Temperaturen wurden nicht durchgeführt. Die radioaktiven Inkubationen erfolgten somit bei der in diesem Labor verwendeten Wachstumstemperatur der Zellen (s. 3.1.). Langsames Bewegen (Schütteln) der Ansätze im auf 25°C temperierten Wasserbad führten, je nach Stärke, zu einer 20-30-prozentigen Hemmung der FAS-Aktivität.

3.9. MOLEKULARGEWICHTSBESTIMMUNG DER FETTSÄURESYNTHETASE AUS C.COHNII UND IHRER UNTEREINHEITEN

3.9.1. VERSUCHE ZUR BESTIMMUNG DER MOLEKULAREN GRÖSSE MITTELS ULTRAFILTRATION ÜBER AMICON-MEMBRANEN

Zur annähernden Bestimmung der Größe des nativen Enzyms wurde die nach 3.6.8. gereinigte FAS über XM 50-, XM 100A- und XM 300-Membranen konzentriert (die Durchlaßgröße der benutzten AMICON-Membranen betrug laut Angabe der Herstellerfirma: 50000, 100000 und 300000 Dalton). Das Ergebnis der Konzentrierungsversuche ist in Tab. 3-21 zusammengefaßt.

Tab. 3-21: Ultrafiltration von gereinigter C.cohnii-FAS über AMICON-Membranen

Membrantyp	Gesamtprotein in mg im Konzentrat	/ Durchlauf	FAS-Aktivität (μU) im Konzentrat	/ Durchlauf	Aktivitätsausbeute (%)
XM 50	2.3	1.15	13667	-	77.1
XM 100A	2.04	1.69	13110	-	74.0
XM 300	1.54	1.87	10056	4351	81.3

Eingebracht in die Ultrafiltrationsapparatur wurden jeweils 12 ml von vereinigten FAS-Fraktionen der Gelfiltration (s. 3.6.7.) mit je 4.2 mg Enzymprotein und einer FAS-Gesamtaktivität von 17716 μU (= 100%). Die einzelnen Proben wurden auf ein Achtel bis ein Zehntel ihres Ausgangsvolumens konzentriert.

FAS-Aktivität: 1 μU = 1 pMol Malonyl-CoA umgesetzt pro min bei 22°C.

Wie die in Tab. 3-21 aufgeführten Daten zeigen, ging die Konzentrierung mit einem leichten Verlust an Protein und FAS-Aktivität einher. Die erzielte Anreicherung durch die Ultrafiltration betrug zwischen 1.4 und 1.6fach in den o.a. Beispielen. Während sich bei Konzentrierungen über XM 50- bzw. XM 100A-Membranen sämtliche wiedergefundene FAS-Aktivität im Konzentrat befand, resultierte die Einengung der Enzymsuspension über XM 300-Membranen stets in einer Aufteilung der FAS-Aktivität zwischen Konzentrat (65-80% der wiedergefundenen Aktivität) und Durchlauf (20-35%).

3.9.2. GELFILTRATIONEN GEREINIGTER C.COHNII-FAS

Bei der Gelfiltration gereinigter Fettsäuresynthetase wie auch von 100000xg-Überstand (s.a. 3.4.8.) über Sephadex G-100 erschien die Enzymaktivität stets im Ausschlußvolumen (v_o) der Säulen und wanderte nicht in das Gelmaterial ein. Anders verhielt es sich bei der Gelfiltration des Enzyms über Sepharose 6B bzw. CL-6B und Sepharose 4B (s. 3.6.7., Abb. 3-20 bis 3-22). Hier eluierte die Hauptmenge an wiedergefundener FAS-Aktivität stets im oder leicht versetzt zum Elutionsvolumen von Ferritin (Molekulargewicht: 4.5×10^5 Dalton). Mitunter wurde jedoch auch mengenmäßig geringere Enzymaktivität im Ausschlußvolumen der Säulen sowie im Bereich zwischen v_o und dem Elutionsvolumen von Ferritin festgestellt. Dies deutet auf die Möglichkeit des Vorhandenseins höhermolekularer FAS-Aggregate hin. Der Hauptaktivitätsgipfel der C.cohnii-FAS eluierte bei fünf Säulenläufen mit Enzymen aus verschiedenen Präparationen in einem Molekulargewichtsbereich von 4.7×10^5 bis 3.8×10^5. Aus diesen Daten wurde ein Molekulargewicht der nativen Fettsäuresynthetase von 4.15×10^5 gemittelt. Die benutzten Sepharose-Säulen waren, wie in 3.6.7. beschrieben, durch mehrfache Gelfiltration von Eichproteinen bekannten Molekulargewichts kalibriert worden.

3.9.3. ULTRAZENTRIFUGATION NATIVER C.COHNII-FAS IM SACCHAROSE-DICHTEGRADIENTEN

Die Durchführung und Auswertung der analytischen Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation erfolgte nach der von MARTIN & AMES (1961) publizierten Methode (s.a. 2.12.). Auf die 11-ml-Gradienten (5-30% Saccharose, w/w) wurden bis zu 300 µg Enzymprotein aufgetragen zusammen mit den verwendeten Eichproteinen. Nach Beendigung der Zentrifugation wurden die Röhrcheninhalte in 400-600 µl Portionen aufgefangen, die Dichte der einzelnen Fraktionen im Refraktometer bestimmt und die Protein- bzw. Enzymprofile der Gradienten nach 2.6 bzw. 2.7.1. bis 2.7.4. und 2.7.8.1. bzw. 2.7.7.2. ermittelt. Ein Beispiel einer solchen Dichtegradienten-Zentrifugation und ihrer Auswertung ist in Abb. 3-36, A,B wiedergegeben.

Wie den beiden Abbildungen zu entnehmen ist, zeigte das aus dem Hauptaktivitätsgipfel der Sepharose-4B-Säule (Molekulargewicht um 400000 Dalton, s. Abb. 3-22 aus 3.6.7. und Abschnitt 3.9.2.) erhaltene Enzympräparat in der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation die Neigung, zu höhermolekularen Komplexen zu aggregieren, die mit dem Malonyl-CoA-Einbautest nach 2.7.8.1. signifikante FAS-Aktivität zeigten. Die für die einzelnen FAS-Gipfel bestimmten Molekulargewichte (Abb. 3-36,B) betrugen: A = 830000, B = 605000 und C = 410000 Dalton. Die als C bezeichnete FAS-Spezies repräsentierte dabei knapp 50% der insgesamt wiedergefundenen FAS-Aktivität. Im Ganzen betrachtet führte die Dichtegradienten-Zentrifugation zu einem mehr als 60%igen Verlust an Gesamtaktivität und wurde u.a. aus diesem Grunde nicht als Reinigungsschritt für die Isolierung der C.cohnii-FAS, sondern nur als zusätzliche Methode der Molekulargewichtsbestimmung des nativen Enzyms verwendet.

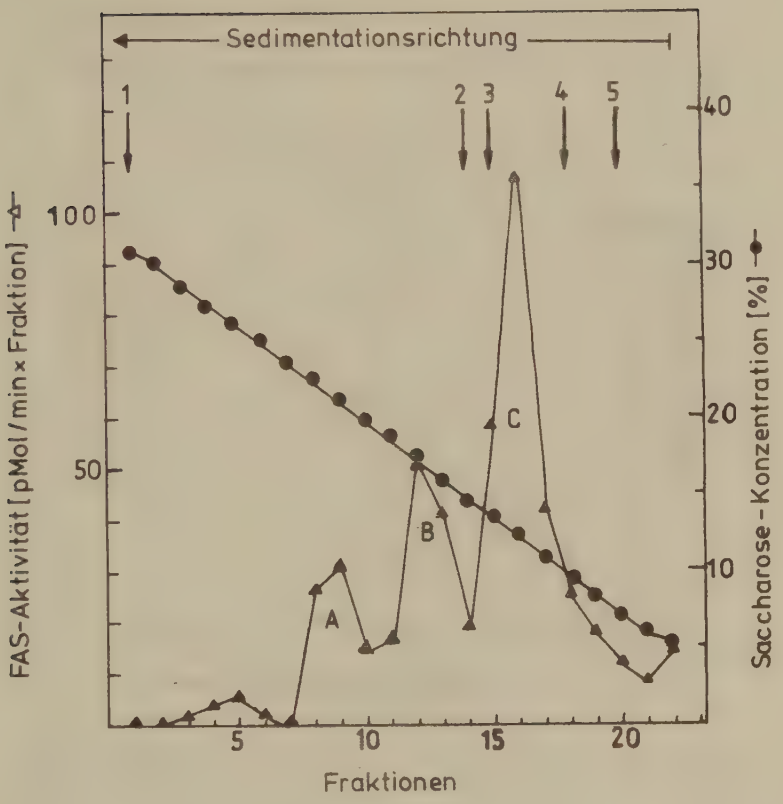


Abb. 3-36,A: Analytische Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation von nach 3.6.8. gereinigter C.cohnii-FAS.

Aufgetragen wurden neben den Eichproteinen 220 µg C.cohnii-FAS mit einer Aktivität von 1368 pMol Malonyl-CoA/min. Nach Beendigung der Zentrifugation wurden Fraktionen à 0.54 ml gesammelt und analysiert.

A,B,C = C.cohnii-FAS-Gipfel; 1-5 = Eichproteine (Hefe-FAS, ß-Galactosidase, Ferritin-Monomer, Catalase und LDH), Molekulargewichte s. 3.5.6. und 3.9.4., ß-Galactosidase: 540000 Dalton.

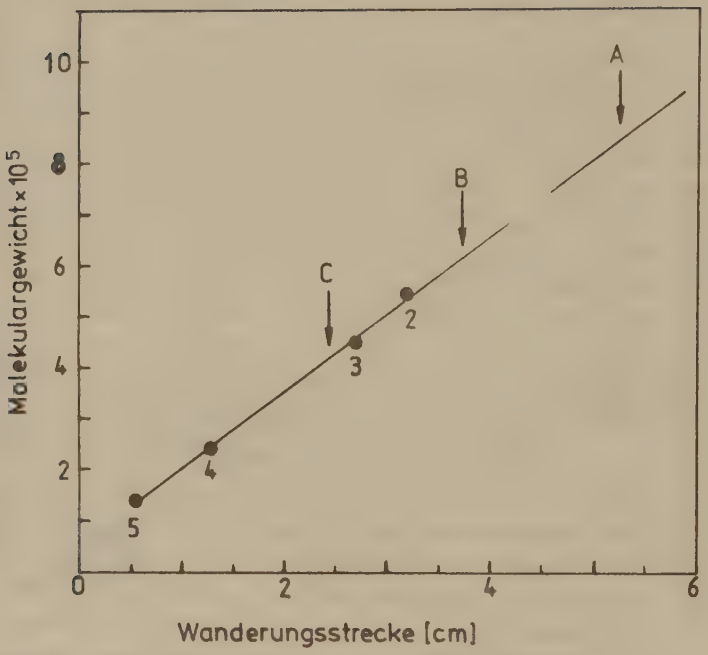


Abb. 3-36,B: Auswertung der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation aus 3.9.3. (s.a. Abb. 3-36,A). Eichproteine: 2-5, s. Abb. 3-36,A. Die hochmolekulare Hefe-FAS (1) erwies sich im benutzten System als ungünstig, da sie unter den verwendeten Bedingungen am Boden des Zentrifugenröhrchens sedimentierte (vergl. (Abb. 3-36,A). A,B,C = angenäherte Molekulargewichte der drei Aktivitätsgipfel der C.cohnii-FAS (s. Abb. 3-36,A).

3.9.4. MOLEKULARGEWICHTSBESTIMMUNG DER C.COHNII-FAS DURCH POLYACRYLAMIDGRADIENTENGEL-ELEKTROPHORESE UNTER NATIVEN BEDINGUNGEN

Die Durchführung der Gradientengel-Elektrophorese (3-20% Acrylamid) erfolgte nach 2.10.2.. Jedes Slabgel wurde durch Elektrophorese von Eichproteinen bekannten Molekulargewichts kalibriert. Als Vergleichsproteine dienten dabei:

1. S.cerevisiae-FAS (gereinigt nach 3.5., Molekulargewicht 2.3 x 10^6 Dalton, s. 3.5.6., Abb. 3-13); 2. Phosphorylase-Kinase (1.3 x 10^6 Dalton); 3. Ferritin-Dimer (9 x 10^5 Dalton); 4. Ferritin-Monomer (4.5 x 10^5 Dalton); 5. Catalase (2.4 x 10^5 Dalton) und 6. LDH (1.4 x 10^5 Dalton). Mitunter wurde den Eichproteinmischungen auch ß-Galactosidase (5.4 x 10^5 Dalton), E.coli-RNA-Polymerase (5 x 10^5 Dalton) und BSA (67000 Dalton) zugesetzt. Ein Beispiel für die Molekulargewichtsbestimmung der C.cohnii-FAS (gereinigt nach 3.6.8.) im 3-20%igen Polyacrylamidgradientengel zeigt Abb. 3-37.

Das apparente Molekulargewicht des nativen Enzyms wurde durch Analyse von 10 Elektrophoreseläufen mit 397000 (± 18000) Dalton bestimmt und ist mit dem unter 3.9.2. bzw. 3.9.3. gefundenen im Rahmen der Genauigkeit der verwendeten Methoden identisch. Zusammenlagerung des Enzyms zu höhermolekularen Komplexen (vergl. 3.9.2. und 3.9.3.) konnte auch in der Gradientengel-Elektrophorese ab und zu beobachtet werden (s.a. 3.6.8., Abb. 3-23), ebenso wie die manchmal stattfindende Dissoziation in Untereinheiten mit annähernd dem halben Molekulargewicht des nativen Enzyms (vergl. 3.9.5., Abb. 3-38,A und B).

3.9.5. BESTIMMUNG DER PROTEINBANDE(N) MIT FAS-AKTIVITÄT NACH POLYACRYLAMIDGRADIENTENGEL-ELEKTROPHORESE VON C.COHNII-ENZYMSUSPENSIONEN UNTER NATIVEN BEDINGUNGEN

Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte nach 2.10.2., die Kalibrierung des Slabgels nach 3.9.4.. Zwei Parallelkanäle des Gels wurden mit jeweils 96 µg proteasefreiem Enzymprotein (im gezeigten Beispiel: Eluat der Hydroxylapatit-Säule, s. 3.6.6.) beladen und nach 2.10.2. elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Beendigung des Laufs wurde der eine Gelkanal zur Sichtbarmachung der Proteinbandierung mit Amidoschwarz angefärbt (Abb. 3-38,A), der andere in jeweils 5 mm große Stücke zerlegt, jedes Gelscheibchen in ein Reagenzglas überführt und mit 1.5 ml 0.1 M

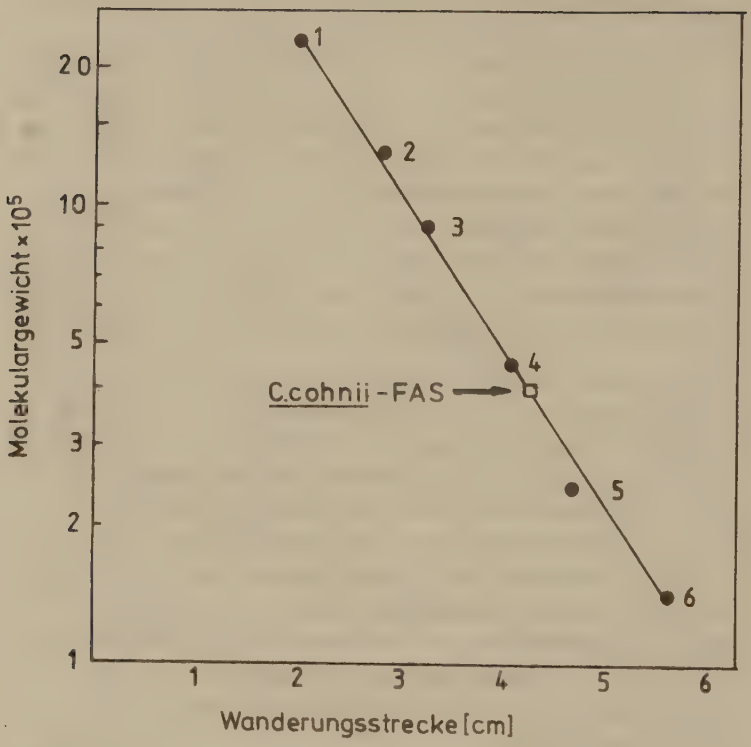


Abb. 3-37: Molekulargewichtsbestimmung der C.cohnii-FAS durch Elektrophorese im Polyacrylamidgradientengel unter nativen Bedingungen.
Bezeichnung der Eichproteine: s. Text.

Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM DTE, 2 mM EDTA-Na_2 und 0.1 M KCl versetzt. Mit einem kleinen Pistill wurden die einzelnen Gelstücke zerdrückt und das Ganze anschließend 48 h lang bei +4-6°C stehengelassen. Danach wurden aus jedem Reagenzglas 750 µl des Überstands als "Enzymlösung" entnommen und 1 h lang bei 22°C in der unter 2.7.8.1. angegebenen Pufferlösung vorinkubiert. Nach erfolgter Zugabe von Coenzym und Substraten wurde eine Stunde lang bei 22°C inkubiert. Die neugebildeten,

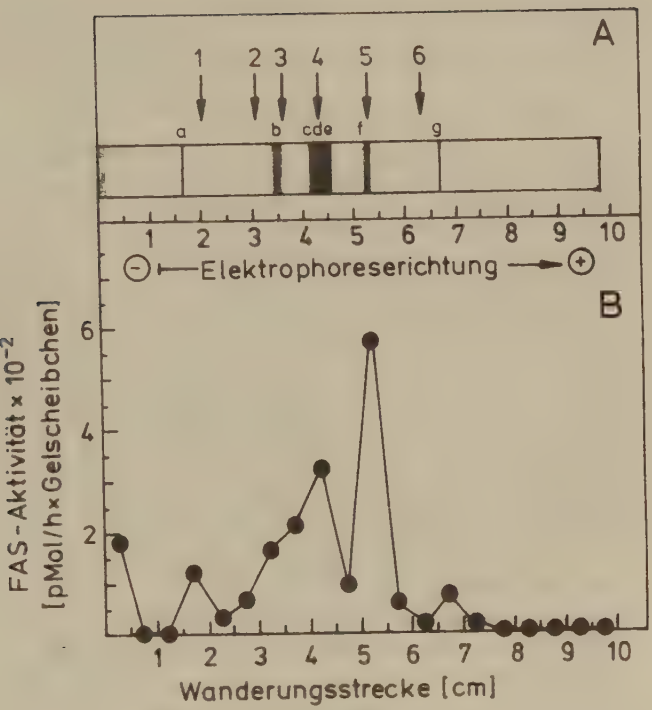


Abb. 3-38: Ermittlung von FAS-Aktivität zeigenden Proteinbanden nach Elektrophorese von C.cohnii-FAS im Polyacrylamidgradientengel (3-20%) unter nativen Bedingungen.

A: Schematische Darstellung der durch Amidoschwarz-Färbung sichtbar gemachten Proteinbanden, Bezeichnung (a-g) nach abnehmendem Molekulargewicht;
Die Wanderungsstrecke der in einem Parallelkanal elektrophoretisierten Eichproteine (Bezeichnung: s. 3.9.4., Abb. 3-37) ist durch Pfeile kenntlich gemacht.

B: Wiedergefundene FAS-Aktivität in den einzelnen Gelabschnitten, angegeben als pMole umgesetztes Malonyl-CoA pro h und Gelscheibchen.

Die Elektrophoreserichtung läuft von links nach rechts (vom ⊖-Pol zum ⊕-Pol).

^{14}C-markierten freien Fettsäuren wurden mit n-Pentan extrahiert, wie in 2.7.8.1. beschrieben, und die radioaktive Ausbeute in 10 ml Toluol-Szintillator im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer bestimmt.

Die Auswertung des (2-^{14}C)-Malonyl-CoA-Einbautests (s. Abb. 3-38,B) ergab eine Aufteilung der FAS-Aktivität in zwei Hauptaktivitätsgipfel und zwei Nebengipfel mit wenig, wenn auch signifikant vorhandener Enzymaktivität. Dabei wurde der höchste Malonyl-CoA-Umsatz durch das Protein des Gelscheibchens erreicht, das einen Molekulargewichtsbereich um 240000 Dalton repräsentierte (Catalase-Bereich), s. Abb. 3-38,A (Bande "f"). Der zweite breiter erscheinende Hauptaktivitätsgipfel umfaßte einen Molekulargewichtsbereich von etwa 1.2×10^6 bis 4×10^5 Dalton, mit der höchsten Einbaurate durch die Proteine (c,d,e) des Gelscheibchens um 4.5×10^5 Dalton Molekulargewicht. Die beiden geringeren Aktivitätsgipfel repräsentierten einen Molekulargewichtsbereich von $\geq 2.3 \times 10^6$ Dalton (Bande "a") bzw. $< 1.4 \times 10^5$ Dalton (Bande "g") und fielen gegenüber der in den beiden Hauptaktivitätsbereichen wiedergefundenen Enzymaktivität nicht ins Gewicht. Die insgesamt wiedergefundene Aktivität betrug knapp 10% der auf die Elektrophorese aufgegebenen Enzymaktivität (316 pMol/min).

3.9.6. BESTIMMUNG DES APPARENTEN MOLEKULARGEWICHTS DER C.COHNII-FAS-UNTEREINHEITEN DURCH POLYACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESE UNTER DENATURIERENDEN BEDINGUNGEN (SDS/HARNSTOFF-PAGE)

Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte nach 2.10.4. Bei der gelelektrophoretischen Analyse von Enzymfraktionen der C.cohnii-FAS-Präparationen wurde dem SDS/Harnstoff-System der Vorzug gegeben, da sich mit dieser Methode eine deutlich schärfere Bandierung ergab als mit dem 'normalen' LÄMMLI-System (nur SDS als denaturierendes Agens); vergl. dazu die Photographien der SDS- und SDS/Harnstoff-Gele in Abb. 3-24. Als Eichproteine wurden verwendet: 1. Urease (240000 Dalton); 2. Hefe-FAS (gereinigt n. 3.5.; A- oder α-Untereinheit: 213000, B- oder ß-Untereinheit: 205000 Dalton); 3. E.coli-RNA-Polymerase (ß'= 165000, ß= 155000, σ= 89000); 4. ß-Galactosidase (135000) und 5. Serumalbumin (BSA; 67000 Dalton). Die Molekulargewichte der Untereinheiten der einzelnen Proteine wurden der Publikation von DARNALL & KLOTZ (1975) entnommen.

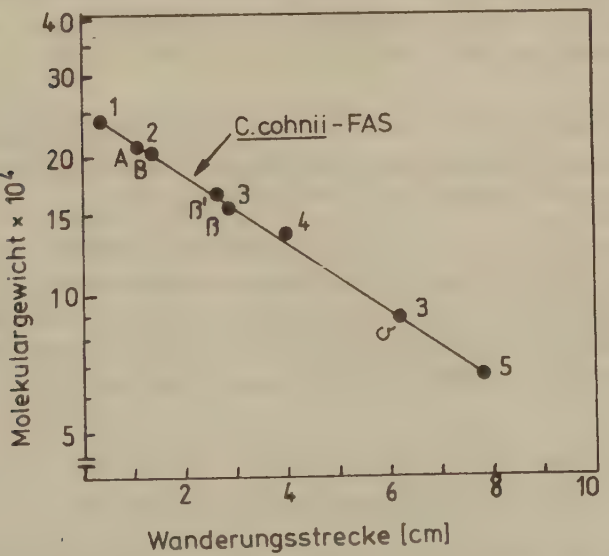


Abb. 3-39: Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheiten der C.cohnii-FAS durch SDS/Harnstoff-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach 2.10.4.
Molekulargewichte der Eichproteine s. Text.

3.9.7. VERSUCHE ZUR IDENTIFIZIERUNG DER C.COHNII-FAS-UNTEREINHEITEN IN SDS-POLYACRYLAMIDGELEN ANHAND GEBUNDENEN RADIOAKTIVEN SUBSTRATS BZW. INHIBITORS

Die Durchführung der Bindungsversuche mit ^{14}C-markiertem Acetyl-CoA, Malonyl-CoA und Jodacetamid erfolgte nach 2.11. Die gelelektrophoretische Analyse der radioaktiven Inkubationsansätze ist in 2.10.1. bzw. 2.11. beschrieben.

Der Versuch, die von STOOPS et al. (1975) bzw. KRESZE et al. (1976) für Fettsäuresynthetasen aus anderen Organismen ausgearbeiteten Methoden auf die C.cohnii-FAS zu übertragen, erbrachte keine befriedigenden Ergebnisse. So betrug - nach erfolgter SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese - die in dem die FAS-Untereinheiten beinhaltenden Gelscheibchen wiedergefundene Radioaktivität selten mehr als 150 cpm. Diese "Ausbeute" konnte auch nicht durch Variation der Inkubationsbedingungen (Raumtemperatur, +4°C, 0°C; verschiedene DTE- bzw. ß-Mercaptoäthanol-Konzentrationen; unterschiedliche Inkubationsdauer und Konzentration der angebotenen Substrate) in größerem Maße beeinflußt werden.

Ein Beispiel für die nach einem Elektrophoreselauf radioaktiver Enzymproben wiedergefundene Ausbeute in den einzelnen Gelabschnitten gibt Abb. 3-40.

Da die in den die C.cohnii-FAS-Untereinheiten enthaltenden Gelscheibchen wiedergefundene Radioaktivität beträchtlich (Faktor 20-50) unter den in der Literatur beschriebenen Werten lag, war eine Identifizierung der Untereinheiten mit Hilfe dieser Methode nicht möglich.

3.10. BESTIMMUNG ENZYMATISCHER TEILAKTIVITÄTEN DER GEREINIGTEN C.COHNII-FAS

Die Bestimmung der Thiolase- sowie der ß-Ketoacyl-Reduktase-Teilaktivität des nach 3.6.8. isolierten Enzyms wurde spektrophotometrisch nach 2.7.11. bzw. 2.7.10. durchgeführt. Andere Teilaktivitäten des Enzymkomplexes wurden nicht bestimmt bzw. waren nicht zu messen.

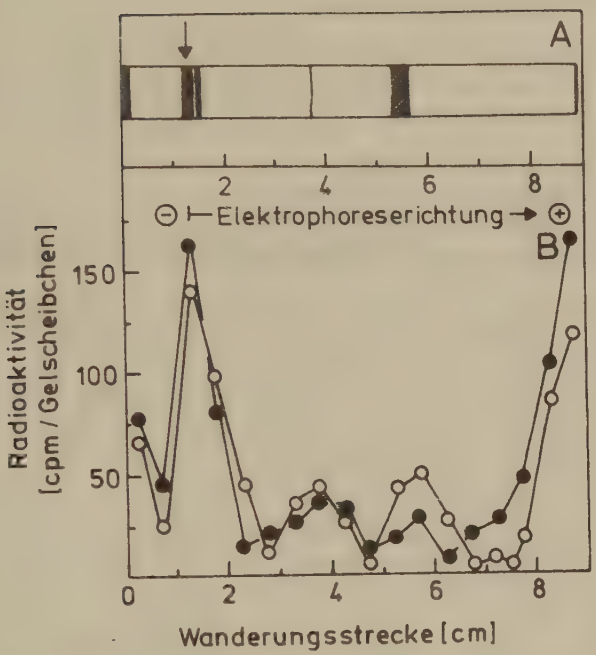


Abb. 3-40: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Inkubationsansätzen aus 3.9.7.

●—● : Radioaktivitätsprofil des Gelkanals einer mit ^{14}C-Malonyl-CoA behandelten Enzymprobe;

o—o : Radioaktivitätsprofil einer mit ^{14}C-Jodacetamid behandelten Enzymprobe.

Die Enzymproben waren (n. STOOPS et al., 1975; bzw. KRESZE et al., 1976;) 5 min bei Raumtemperatur mit entweder 50 nMol Malonyl-CoA (478000 cpm) oder 50 nMol Jodacetamid (427000 cpm) inkubiert worden. Jeder Ansatz enthielt 0.12 mg Protein (HA-EL-II,konz., s. Tab. 3-18). Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gelkanäle mit den radioaktiven Proben in 0.5 cm große Stücke geschnitten, wie in 2.11. beschrieben behandelt und die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen.
Die mit A bezeichnete Abbildung gibt die Proteinfärbung eines Parallelkanals der gleichen Enzymprobe schematisiert wieder. Der Pfeil kennzeichnet die Lokalisierung der C.cohnii-FAS-Untereinheiten.

3.10.1. THIOESTERASE-TEILAKTIVITÄT

Die Messung der terminalen Reaktion des FAS-Zyklus erfolgte durch die in 2.7.11. beschriebene Modifizierung der von BARNES (1975) publizierten Methode.

Das pH-Optimum der Reaktion lag zwischen pH 8.4 und 8.8. Wie in Abb. 3-41 gezeigt wird, besitzt die Thioesterase des gereinigten C.cohnii-FAS-Komplexes eine Präferenz für mittel- bis langkettige Acyl-CoA-Ester.

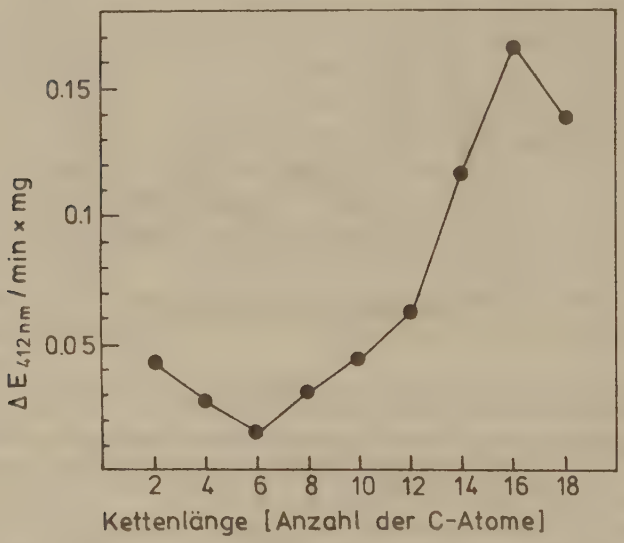


Abb. 3-41: Kettenlängenspezifität der Thioesterase-Teilaktivität der C.cohnii-FAS.

3.10.2. ß-KETOACYL-REDUKTASE-TEILAKTIVITÄT

Die Messung der 1. Reduktion des Biosynthesezyklus erfolgte nach 2.7.10. Das pH-Optimum der Reaktion lag zwischen pH 7.8 und 8.2. Das Enzym zeigte eine deutliche Präferenz für NADH als Coenzym. Bei der entsprechenden NADPH-Konzentration im Test war die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion um rund 80% reduziert.

4. DISKUSSION

4.1. ZÜCHTUNG DER DINOFLAGELLATEN UND ANALYSE DES FETTSÄURE-MUSTERS DER C.COHNII-GESAMTLIPIDE

Züchtungen von C.cohnii-Zellen erfolgten bislang zumeist in dem von PROVASOLI & GOLD (1962) publizierten AXM-Medium, der ersten, für heterotrophe Dinoflagellaten komponierten vollsynthetischen Nährlösung. Das von TUTTLE & LOEBLICH (1975) veröffentlichte und in diesem Labor verwendete MLH-Medium stellt demgegenüber eine deutliche Verbesserung dar. So erzielten die genannten Autoren Zellverdopplungszeiten von rund 8 h, was der höchsten, bisher für heterotrophe wie photoautotrophe Dinoflagellaten bekannten Wachstumsrate entspricht. Die in der vorliegenden Arbeit bei Vermehrung von C.cohnii in MLH-Medium erhaltenen Generationszeiten lagen demgegenüber bei 11-13 h (s. 3.1., Abb. 3-1) und dürften primär auf die hier benutzte, um 5-6°C niedrigere Wachstumstemperatur (21-22°C) zurückzuführen sein. Die in 3.1. genannten Wachstumsraten liegen somit nicht so günstig wie die von TUTTLE & LOEBLICH (1975) erhaltenen, sind allerdings deutlich besser als die von JAVORNICKY (1962), FRANKER (1972) und FRANKER et al. (1973) in modifizierten AXM-Medien erzielten Verdopplungszeiten (18 bzw. 16.5 h, bei 26°C). PROVASOLI & GOLD (1962) veröffentlichten - wie die Mehrzahl der sich mit Wachstums- und Ernährungsstudien von C.cohnii befaßt habenden Autoren - keine Wuchskurven und berichteten auch nicht über erhaltene Generationszeiten, gaben aber für die Züchtung der Dinoflagellaten in ihrem AXM-Medium das Erreichen einer optischen Dichte von 1.0 bis 1.4 innerhalb von 7 Tagen an. Im Vergleich dazu erreichten die nach 2.13. gezogenen Zellen nach rund 5 Tagen (gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase, s. Abb. 3-1) eine OD_{590} von 0.8 bis 1.0.

Verlangsamtes Zellwachstum bei Züchtung im Licht sowie bei mechanischer Bewegung der Kulturen wurde bereits von TUTTLE & LOEBLICH (1975) beschrieben, die neben den chemischen auch die physikalischen Parameter der Zellvermehrung ausführlich untersuchten. Gleiches wurde für das Wachstum des in diesem Labor verwendeten C.cohnii-Stamms beobachtet (s. 2.13. und 3.1.). Die von den o.g. Autoren vorgeschlagene Zellzüchtung unter Lichtabschluß und Berücksichtigung eines möglichst großen Oberfläche/Volumen-Verhältnisses der Kulturen erwies sich als die beste Methode zum Erzielen guter Vermehrungsraten und Zellausbeuten. Das von BEACH & HOLZ (1973) bei der Züchtung von C.cohnii in AXM-Medium verwendete mechanische Schütteln der Kulturen bzw. deren Durchblasen mit steriler Luft zwecks besserer Sauerstoffversorgung der Zellen, was für die zur Biosynthese der Docosahexaensäure notwendigen Desaturierungsschritte von Wichtigkeit sein könnte (s. Kap. 1., "EINLEITUNG"), führte in unseren Händen zu reduzierten Wachstumsraten und einer bis zu 70% geringeren Zellausbeute (s. 2.13. und 3.1.).

Trotz abweichender physikalischer Parameter bei der Zellvermehrung (21-22°C statt 25°C, stehende anstelle mechanisch bewegter Kulturen) und Benutzung eines unterschiedlichen Kulturmediums (MLH- statt AXM-Medium) entsprachen Zusammensetzung und prozentuale Verteilung der Fettsäuren aus der Gesamtlipidfraktion so gezogener Dinoflagellaten den von HARRINGTON & HOLZ (1968) publizierten Werten (s. 3.2., Tab. 3-1 und Abb. 3-2). Ein negativer Einfluß der Zellvermehrung in stehenden anstelle mechanisch bewegter Kulturen auf die Menge an gebildeter Docosahexaensäure ($C_{22:6,\Delta^{4,7,10,13,16,19}}$, n-3), wie von den beiden Autoren behauptet, konnte nicht beobachtet werden (Tab. 3-1). Dies läßt den Schluß zu, daß die O_2-Versorgung der Zellen und damit der zelleigenen Desaturasen ausreichend war.

4.2. SUBZELLULÄRE LOKALISIERUNG DES DE NOVO-BIOSYNTHESESYSTEMS DER FETTSÄUREN IN C.COHNII

Die de novo-Biosynthese der gesättigten, geradzahligen Fettsäuren findet normalerweise im Cytoplasma der Zelle statt (VAGELOS, 1971; KUNAU, 1976; KATIYAR & PORTER, 1977; STOOPS et al., 1977; SCHWEIZER et al., 1978). Die Fähigkeit

von mikrosomalen Partikeln zur Neusynthese langkettiger Fettsäuren (DONALDSON et al., 1970; LANDRISCINA et al., 1970; KHAN & KOLATTUKUDY, 1973; BOLTON & HARWOOD, 1977) stellt im Vergleich dazu ein seltenes Phänomen dar und dürfte - ebenso wie die früher verfochtene de novo-Biosynthesekapazität der Mitochondrien (WAKIL et al., 1960; HARLAN & WAKIL, 1963; BARRON, 1966; COLLI et al., 1969; SEUBERT, 1970) - physiologisch von untergeordneter Bedeutung sein und besonders im Falle der mitochondrialen Fettsäurebiosynthese eher die historische Entwicklung der Erforschung des Lipid-Intermediärstoffwechsels widerspiegeln. Eine besondere Stellung nehmen hingegen die höheren Pflanzen ein, wo die Systeme der Fettsäureneubildung aller Wahrscheinlichkeit nach in den Chloroplasten lokalisiert sind (HARWOOD, 1975; STUMPF, 1975; HARWOOD & STUMPF, 1976; QUINN & WILLIAMS, 1978; OHLROGGE et al., 1979).

Wie bei den meisten eukaryotischen Organismen ist auch bei C.cohnii das Cytoplasma Hauptbiosyntheseort der aus Acetyl- und Malonyl-CoA de novo synthetisierten Fettsäuren (s. 3.3., Tab. 3-2). Der im elektronenoptischen Bild partikelfreie 100000xg-Überstand zeigte in allen untersuchten Fällen zwischen 92 und 98% der durch den Einbau von (2-^{14}C)-Malonyl-CoA in langkettige Fettsäuren meßbaren FAS-Aktivität. Ein signifikanter, um 5% betragender Anteil an der de novo-Biosynthese war im Sediment der Ultrazentrifugation zu finden, das sich bei Betrachtung im Elektronenmikroskop als zum Großteil aus Membranfragmenten zusammengesetzt erwies. Dies muß jedoch kein Beweis für mikrosomale Neusynthesekapazität sein, da es sich auch um FAS-Aktivität cytoplasmatischen Ursprungs handeln kann, die während der Zentrifugation von den sedimentierenden Membranpartikeln mitgerissen worden ist. Eine andere Erklärungsmöglichkeit für die "mikrosomale" FAS-Aktivität wäre eine lockere Assoziierung der C.cohnii-Synthetase an das endoplasmatische Reticulum in vivo, die beim Zellaufschluß bzw. der nachfolgenden differentiellen Zentrifugation zerstört worden sein könnte. Da jedoch stets mehr als 90% der im post-mitochondrialen bzw. -lysosomalen Überstand enthaltenen FAS-Aktivität im 100000xg-Überstand wiedergefunden wurde (Tab. 3-2),

erfolgte keine weitere Untersuchung dieser "mikrosomalen" FAS-Aktivität. Man konnte auf Grund der aus mehreren Präparationen erhaltenen Daten davon ausgehen, daß die Fettsäuresynthetase aus C.cohnii ein lösliches Enzymsystem des Cytosols repräsentiert.

4.3. CHARAKTERISIERUNG DER DE NOVO-BIOSYNTHESE DER FETTSÄUREN IN C.COHNII: VERGLEICH DER ENZYMATISCHEN EIGENSCHAFTEN DES 100000xg-ÜBERSTANDS UND DER GEREINIGTEN FAS

Eine vorläufige Charakterisierung der Testbedingungen sowie eine Analyse der entstehenden Endprodukte der C.cohnii-FAS-Reaktion wurde aus zwei Gründen bereits im 100000xg-Überstand durchgeführt: 1. galt es für die spätere Isolierung der Fettsäuresynthetase eine Methode in Händen zu haben, mit der die enzymatische Aktivität während der verschiedenen Reinigungsschritte verfolgt werden konnte, und 2. sollte durch Vergleich der Eigenschaften des 100000xg-Überstand-Enzyms mit denen der gereinigten FAS sichergestellt werden, daß während der Isolierungsprozedur keine, z.B. das Reaktionsproduktmuster beeinflussende Faktoren von der C.cohnii-FAS abgetrennt worden waren.

Die Überprüfung der Proteinabhängigkeit der de novo-Biosynthese im 100000xg-Überstand ergab, daß der Einbau von (2-^{14}C)-Malonyl-CoA in langkettige Fettsäuren bis zu einer Konzentration von 0.25 mg Enzymprotein pro ml Testvolumen linear anstieg (s. 3.4.1., Abb. 3-3). Erhöhung der Proteinkonzentration führte zu einem Abflachen der Kurve und somit zu verringerter spezifischer Aktivität (-17% bei 1 mg/ml, -39% bei 2.5 mg/ml). Bei gereinigtem Enzym wurde der lineare Bereich erwartungsgemäß schon bei niedrigeren Proteinkonzentrationen überschritten (vergl. 3.7.1., Abb. 3-25). Hier war linearer Verlauf nur bis zu maximal 75 µg pro ml gewährleistet.

Da es sich auf Grund des Testaufbaus um eine Endproduktsbestimmung handelte, wobei die FAS-Aktivität anhand der Menge an neugebildeten, ^{14}C-markierten Fettsäuren bestimmt wurde, galt es, die Zeitabhängigkeit des Malonyl-CoA-Einbaus genau zu überprüfen. Es zeigte sich, daß die Fett-

säurebiosynthese im 100000xg-Überstand bis zu einer Inkubationsdauer von 45 min linear anstieg (s. 3.4.2., Abb. 3-4). Für partiell angereinigte Enzymfraktionen sowie für die von Fremdproteinen freie C.cohnii-FAS wurde eine Inkubationsdauer von 10-20 min gewählt. Ein Vergleich von aus spätlogarithmischen (5-Tage-Kulturen) und aus stationären, 10-11 Tage alten Zellen gewonnenen 100000xg-Überständen ergab zwar bei beiden Enzymquellen eine Zeitlinearität der FAS-Reaktion von bis zu 45 min (s.o.), machte jedoch auch deutlich, daß die Enzymaktivität der spätlogarithmischen 100000xg-Überstände um rund 40% über der der stationären lag (Abb. 3-4). Obwohl die aus stationären Zellen gewonnenen Überstände der Ultrazentrifugation in der Regel mehr Gesamtprotein enthielten (25-40%), wurden für die Charakterisierung der de novo-Biosynthese und die spätere Isolierung der C.cohnii-FAS nur 100000xg-Überstände aus spätlogarithmischen Zellen benutzt, da wegen der geringen spezifischen Aktivität der Dinoflagellaten-FAS (vergl. 3.6.8., Tab. 3-18, und 3.5.5., Tab. 3-9) eine Enzymquelle mit möglichst aktiver Fettsäuresynthetase als Ausgangsmaterial erwünscht war.

Das pH-Optimum der FAS-Reaktion im 100000xg-Überstand lag - wie beim gereinigten Enzym - in einem für Fettsäuresynthetasen ungewöhnlich alkalischen pH-Bereich (pH 8.2-8.6; s. 3.4.3., Abb. 3-5, und 3.7.2., Abb. 3-26). Die für andere Synthetasen gefundenen pH-Optima sowie die verwendeten Pufferlösungen sind zum Vergleich in Tab. 4-1 in einer repräsentativen Auswahl zusammengestellt. Wie den dort angegebenen Daten zu entnehmen ist, kann das für die C.cohnii-FAS gefundene pH-Optimum in etwa nur mit dem von KHAN & KOLATTUKUDY (1973) beschriebenen Wert (pH 8.0) für zur de novo-Biosynthese von Fettsäuren befähigten Mikrosomen aus Euglena gracilis verglichen werden. Welche der verschiedenen enzymatischen Teilaktivitäten primär für dieses extreme pH-Optimum verantwortlich zeichnet, konnte nicht eindeutig geklärt werden, da es nicht möglich war - wahrscheinlich aus Gründen der insgesamt geringen FAS-Aktivität -, sämtliche am Fettsäurebiosynthesezyklus beteiligten Einzelaktivitäten zu messen. Die beiden spektrophotometrisch bestimmbaren Teilaktivitäten Thioesterase und

Tab. 4-1: pH-Optima der Fettsäure-de-novo-Biosynthese (FAS-Reaktion) in Pro- und Eukaryonten

Organismus	FAS-Typ[+]	pH-Optimum	Puffer[++]	Literaturnachweis
E.coli/B.subtilis	II	7.0	0.1 M PP	BUTTERWORTH & BLOCH, 1970
Euglena gracilis-Chloroplasten	II	7.0	0.1 M PP	HENDREN & BLOCH, 1980
E.gracilis, etioliert	IB	7.2	0.1 M TES	HENDREN & BLOCH, 1980
E.gracilis-Mikrosomen	?	8.0	0.1 M PP	KHAN & KOLATTUKUDY, 1973
Corynebacterium diphtheriae	IB	7.3	0.5 M PP	KNOCHE & KOTHS, 1973
Mycobacterium smegmatis	IB	7.0	0.1 M PP	VANCE et al., 1973
Streptomyces erythreus	IB	7.5	0.1 M PP	ROSSI & CORCORAN, 1973
Brevibacterium ammoniagenes	IB	7.3	0.4 M PP	KAWAGUCHI & OKUDA, 1977
Saccharomyces cerevisiae	IB	6.5	0.1 M PP	LYNEN, 1969; STOOPS et al., 1978a
Candida lipolytica	IB	6.8	0.1 M PP	MEYER & SCHWEIZER, 1976
Aspergillus fumigatus	IB	7.5	0.2 M PP	GIOMPRES & PACKTER, 1978
Penicillium patulum	IB	7.6	0.1 M PP	HOLTERMÜLLER et al., 1970
Chlamydomonas reinhardii	IB	7.2	0.1 M PP	SIREVÅG & LEVINE, 1972
Rattenbrustdrüsen	IA	6.6	0.1 M PP	SMITH & ABRAHAM, 1975
Kaninchen-brustdrüsen	IA	6.6	0.2 M PP	DILS & CAREY, 1975
Schweineleber	IA	6.9	0.1 M PP	KIM et al., 1977
Rattenleber	IA	6.5	75 mM PP	STOOPS et al., 1979
Taubenleber	IA	6.8	0.2 M PP	MUESING & PORTER, 1975
Hühnerleber	IA	6.5	75 mM PP	ARSLANIAN & WAKIL, 1975
Crypthecodinium cohnii	IA	8.3	0.1 M Tris-HCl	vorliegende Arbeit

[+] FAS-Typ: s. Kap. 1; "EINLEITUNG", Tab. 1-1.

[++] PP = Phosphatpuffer

ß-Ketoacyl-Reduktase (s. 3.10.1. und 3.10.2.) zeigten allerdings mit einem pH-Optimum von 7.8 bis 8.2 bzw. 8.4 bis 8.8 (vergl. auch 2.7.10. und 2.7.11.) eine Präferenz für relativ alkalische pH-Werte. Letzteres steht in Übereinstimmung mit dem für die Thioesterase-Teilaktivität der Fettsäuresynthetase aus Rattenbrustdrüsen publizierten pH-Optimum (AGRADI & SMITH, 1976).

Wie alle bisher untersuchten Fettsäurebiosynthesesysteme zeigte auch die C.cohnii-FAS Bedürftigkeit für den Zusatz von SH-Schutzsubstanzen zum Inkubationsmedium (s. 3.4.4, Abb. 3-6). Dabei ließ sich für die untersuchten Reagenzien folgende Effektivitätsreihe für das Enzym des 100000xg-Überstands aufstellen: 20 mM Cystein ≙ 2 mM DTE < 5 mM ß-Mercaptoäthanol < 5 mM DTE. Bei Vorhandensein von nur 0.1 mM DTE im Testansatz war die Enzymaktivität im Vergleich zum mit 2 mM DTE erzielten Wert um mehr als 80% reduziert (Abb. 3-6). Gereinigte C.cohnii-FAS zeigte ebenfalls eine kontinuierliche Steigerung des enzymatischen Umsatzes bis zu einer Konzentration von 5 mM DTE im Test (s. 3.8.2., Abb. 3-31). Höhere DTE-Dosen führten zu einer weiteren, allerdings verlangsamten Aktivitätszunahme, jedoch gleichzeitig zu einer starken Erhöhung der aus Kontrollansätzen (ohne Enzymprotein) extrahierbaren Radioaktivität. Höhere Konzentrationen als 5 mM DTE im Inkubationsmedium wurden daher vermieden.

Bisher untersuchte Fettsäuresynthetasen benötigen oftmals nur NADPH als Reduktionsäquivalent für beide während des Synthesezyklus stattfindenden Reduktionsschritte (VOLPE & VAGELOS, 1976, STOOPS et al., 1977; KATIYAR & PORTER, 1977). Es sind jedoch auch Fälle bekannt, bei denen einer der Reduktionsschritte eine Präferenz für NADH zeigt (WHITE et al., 1971; SIREVÅG & LEVINE, 1972; KHAN & KOLATTUKUDY, 1973; KNOCHE & KOTHS, 1973; VANCE et al., 1973; KAWAGUCHI & OKUDA, 1977; HENDREN & BLOCH, 1980). Dabei handelt es sich ausschließlich um pro- und eukaryotische Mikroorganismen, deren Fettsäuresynthetasesysteme als Klasse-IB-Enzyme (s. Kap. 1., "EINLEITUNG") identifiziert wurden, während die FAS-Systeme der Vertebraten stets nur NADPH-abhängig sind. WHITE et al. (1971)

konnten zeigen, daß in Mycobacterium smegmatis die Enoyl-Reduktase-Teilaktivität NADH als Coenzym vorzieht, während der 1. Reduktionsschritt NADPH-abhängig ist. Bei C.cohnii konnte Einbau von radioaktivem Malonyl-CoA in langkettige Fettsäuren bei Verwendung von partikelfreiem 100000xg-Überstand sowohl mit NADH als auch mit NADPH als alleinigem Coenzym gezeigt werden (s. 3.4.5., Abb. 3-7). Dieses Ergebnis könnte auch durch im Überstand der Ultrazentrifugation vorhandene Transhydrogenase(n) erklärt werden. Die höchste Enzymaktivität wurde jedoch durch eine Kombination beider Coenzyme erzielt. Dies ist auch von anderen Fettsäuresynthetasen her bekannt, die beide Reduktionsäquivalente für eine optimale Synthesekapazität benötigen (s. oben zitierte Arbeiten). Bei gereinigter C.cohnii-FAS wurde ein ähnlicher Effekt beobachtet. Hier blieb der enzymatische Umsatz über einen weiten Konzentrationsbereich beider Coenzyme konstant (0.005-0.25 mM für NADPH; 0.025-0.5 mM für NADH; s. 3.7.3., Abb. 3-27).Eine deutliche Abnahme der spezifischen Aktivität war erst bei Verringerung der Coenzymkonzentrationen auf 0.005-0.0025 mM zu beobachten.Bei höheren Dosen (ab 0.5 mM für NADPH und 1 mM für NADH) war eine Hemmung der FAS-Reaktion zu verzeichnen. 50%ige Hemmung wurde bei 3.5 mM NADPH bzw. 2 mM NADH registriert. Aus den genannten Gründen enthielt der endgültige Enzymtest jeweils 0.2 mM NADPH und NADH (s.a. 2.7.8.1.). Die Bestimmung der ß-Ketoacyl-Reduktase-Teilaktivität des gereinigten Enzyms (s. 2.7.10. und 3.10.2.) ergab interessanterweise eine Präferenz dieses Reduktionsschritts für NADH. Mit NADPH als Reduktionsmittel wurde nur eine 15-25%ige Umsetzung des künstlichen Substrats S-Acetoacetyl-N-acetyl-cysteamin erzielt. Dies ist verschieden von den bei Mycobacterium smegmatis beobachteten Vorgängen (WHITE et al., 1971).

Versuche zur Biosynthese langkettiger Fettsäuren unter Verwendung von 100000xg-Überstand als Enzymquelle und (1-^{14}C)-Acetat als Substrat, analog der von WEAIRE & KEKWICK (1975a,b) sowie von NOTHELFER et al. (1977) benutzten Methoden zur Fettsäurebiosynthese im zellfreien System, erbrachten keinen signifikanten Radioaktivitätseinbau in Pentan-extrahierbares Material (s. 3.3.).

Dies kann entweder auf die Zerstörung eines der an der von Acetat ausgehenden de novo-Biosynthese beteiligten Enzyme (Acetyl-CoA-Synthetase, Acetyl-CoA-Carboxylase oder FAS) während des Zellaufschlusses bzw. der nachfolgenden differentiellen Zentrifugation zurückzuführen sein oder auf eine Membranbindung bzw. Organellenlokalisierung einer der drei Komponenten. Letztgenannte Möglichkeit (Organellen- bzw. Membranlokalisierung) gilt für die Acetyl-CoA-Carboxylase aus einigen Organismen und Geweben als wahrscheinlich (YANG & STUMPF, 1965; BROOKS & STUMPF, 1966; MARGOLIS & BAUM, 1966; EASTER & DILS, 1968; KANNANGARA & STUMPF, 1972; MAZLIAK, 1973; VOLPE & VAGELOS, 1976), desgleichen für die Acetyl-CoA-Synthetase aus Torpedo marmorata-Synaptosomen und aus Säugergehirn, die dort hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisiert sein dürfte (SCHUBERTH, 1965; TUČEK, 1970; TENCATI & ROSENBERG, 1973; REIJNIERSE et al., 1975; MOROT-GAUDRY & DIEBLER, 1979).

Die Substratspezifität gereinigter C.cohnii-FAS für Acetyl- bzw. Malonyl-CoA wurde in Kap. 3.7.4. in einem Konzentrationsbereich von 5 µM bis 1 mM untersucht. Dabei zeigte sich, daß die FAS-Aktivität über einen weiten Konzentrationsbereich konstant blieb (25-500 µM für Malonyl-CoA und 10-250 µM für Acetyl-CoA, s. Abb. 3-28). Für die beiden Substrate wurden K_M-Werte von 2.8 µM (Malonyl-CoA) bzw. 1.3 µM (Acetyl-CoA) ermittelt. Eine Reduzierung der enzymatischen Aktivität war bei Malonyl-CoA erst bei Erniedrigung der Substratkonzentration auf 10 bzw. 5 µM, bei Acetyl-CoA erst bei Erniedrigung auf 5 µM festzustellen. Bei höheren Substratkonzentrationen war eine Hemmung der Fettsäurebiosynthese zu verzeichnen (>0.5 mM Malonyl-CoA und >0.25 mM Acetyl-CoA). Die Hemmung des enzymatischen Umsatzes war bei vergleichbaren Konzentrationen beim Acetyl-CoA deutlicher ausgeprägt als beim Malonyl-CoA (30% bei 0.5 mM und 70% bei 1 mM Acetyl-CoA) und die FAS-Aktivität nur über einen schmaleren Konzentrationsbereich konstant. Aus den aus Abb. 3-28,A und B ersichtlichen Daten wurde für den radioaktiven FAS-Test eine Konzentration der beiden Substrate von 75 µM Acetyl-CoA und 150 µM Malonyl-CoA

gewählt. In Abwesenheit des als Startermolekül der de novo-Biosynthese dienenden Acetyl-CoA war die FAS-Aktivität zwar auf 77-80% desjenigen Wertes reduziert, der mit 75 bzw. 150 µM (s.o. und 2.7.8.1.) erreicht wurde, aber immer noch signifikant vorhanden. Dies deutet auf das Vorhandensein einer Malonyl-CoA-Decarboxylase-Aktivität der Enzympräparate hin, wie von BURTON et al. (1968), CAREY & DILS (1970), HANSEN et al. (1971), KATIYAR et al. (1974) und BUCKNER & KOLATTUKUDY (1976) für einige aus Säugetier- und Vogelorganen gewonnene Fettsäuresynthetasen gezeigt werden konnte. Ob es sich hierbei um eine Teilaktivität der C.cohnii-FAS oder um eine nicht abgetrennte Verunreinigung des Enzyms handelt, kann nach den vorliegenden Ergebnissen der Reinigung nicht geklärt werden, da auch 70-100fach gereinigte FAS beim Auftrag hoher Proteinmengen auf SDS- und SDS/Harnstoffgele Banden mit niedrigerem Molekulargewicht als die FAS-Untereinheit(en) zeigte (s. 3.6.8., Abb. 3-24). Das Ausmaß des enzymatischen Umsatzes hängt allerdings bei den meisten Fettsäuresynthetasen nicht nur vom Vorhandensein ausreichender Konzentrationen beider Substrate ab, sondern wird - ebenso wie das Endproduktmuster der Reaktion - auch vom im Inkubationsmedium vorhandenen Verhältnis von Acetyl- und Malonyl-CoA zueinander bestimmt (LYNEN et al., 1964;NANDEDKAR et al., 1969; SUMPER et al., 1969; HANSEN et al., 1970; HOLTERMÜLLER et al., 1970; CAREY & DILS, 1970; GOLDBERG & BLOCH, 1972; STRONG & DILS, 1972; KHAN & KOLATTUKUDY, 1973; SMITH & ABRAHAM, 1975; LINN et al., 1980). Dieser Effekt war auch bei der C.cohnii-FAS zu beobachten (s. 3.7.4., Abb. 3-29). Während ein Überschuß von Acetyl-CoA zu einer drastischen Hemmung der Enzymaktivität führte (s. Aktivität bei einem Malonyl- zu Acetyl-CoA-Verhältnis von 1:10 = 0.1, 25 µM Malonyl-CoA und 250 µM Acetyl-CoA im Test) war dieses erst in geringerem Ausmaße bei einem großen Malonyl-CoA-Überschuß zu erreichen (s. Aktivität bei 40:1, 400 µM Malonyl-CoA + 10 µM Acetyl-CoA). Die höchste spezifische Aktivität wurde bei einem Verhältnis von Malonyl- zu Acetyl-CoA von 2:1 bis 10:1 erreicht. Das o.a. Verhältnis von 150 µM Malonyl-CoA + 75 µM

Acetyl-CoA (= 2:1) wurde deshalb im Standardansatz (s. 2.7.8.1.) verwendet. Wie Tab. 3-19 zu entnehmen ist, verschob sich - ähnlich wie bei der S.cerevisiae-FAS (SUMPER et al., 1969), der FAS aus Penicillium patulum (HOLTERMÜLLER et al., 1970), und der FAS aus Rattenleber (HANSEN et al., 1970) - das Fettsäuremuster der de novo gebildeten Acylketten zum kürzerkettigen Spektrum. Während bei 150 µM Malonyl- und 75 µM Acetyl-CoA im Testansatz (Verhältnis 2:1, s.o.) kein (oder nur unwesentlicher) Einbau von radioaktivem Malonyl-CoA durch gereinigte C.cohnii-FAS in $C_{10:0}$ und $C_{12:0}$ zu beobachten war (s. Tab. 3-19 und 3-20), waren beide Säuren bei 5fachem Überschuß an Acetyl-CoA zu signifikanten Anteilen (7% und 14%) markiert. Dieser Effekt der Verschiebung des FAS-Reaktionsproduktmusters wurde von LYNEN und Mitarbeitern (SUMPER et al., 1969) sowie HANSEN et al. (1970) damit erklärt, daß die Verfügbarkeit von Malonyl-CoA für die Kondensationsreaktion darüber entscheidet, ob die wachsende Acylkette weiter durch Anknüpfen zusätzlicher C_2-Einheiten verlängert oder aber vom Enzymkomplex freigesetzt wird. Dies bedeutet, daß die Kondensationsreaktion durch die ß-Ketoacyl-Synthetase die Kettenlänge der entstehenden Reaktionsprodukte direkt beeinflußt, was neben der Thioesterase bzw. der Palmityl-Transferase, die kettenlängenspezifisch agieren, ein zusätzliches Kontrollelement für das entstehende Fettsäuremuster darstellt.

Die Endprodukte der FAS-Reaktion im 100000xg-Überstand liegen bei C.cohnii zu 80% als freie Fettsäuren vor (s. 3.4.6., Tab. 3-3) und zu 20% als Acyl-CoA-Ester. Diese Verteilung ist bei aus spätlogarithmischen wie aus stationären Zellen gewonnenen 100000xg-Überständen identisch. Bei gereinigter C.cohnii-FAS war keine Acyl-CoA-Estersynthese mehr festzustellen (s. 3.7.5.), was durch die in gereinigten Enzympräparaten gefundene Thioesterase-Aktivität erklärbar wird (s. 3.10.1.). Die entstandenen Fettsäuren werden demnach ähnlich wie im tierischen System (VOLPE & VAGELOS, 1976; STOOPS et al., 1977) auf H_2O und nicht wie in der Hefe (LYNEN, 1969; SCHWEIZER et al., 1978), Mycobacterium smegmatis

(BLOCH, 1977), Brevibacterium ammoniagenes (KAWAGUCHI & OKUDA, 1977) und Aspergillus fumigatus (GIOMPRES & PACKTER, 1978) auf CoASH übertragen.

Das mit 100000xg-Überstand als Enzymquelle erzielte Muster der FAS-Reaktionsprodukte enthielt hauptsächlich Myristinsäure ($C_{14:0}$), rd. 50%, und Palmitinsäure ($C_{16:0}$), 24%. Laurinsäure ($C_{12:0}$) und Stearinsäure ($C_{18:0}$) waren in geringeren Mengen vertreten (15 bzw. 12%). Ein signifikanter Malonyl-CoA-Einbau in längerkettige Fettsäuren war nicht festzustellen (s. 3.4.7., Abb. 3-8,A; Tab. 3-4). Diese Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Fettsäuren änderte sich jedoch bereits bei Konzentrierung des 100000xg-Überstands durch Ultrafiltration über AMICON-Membranen (s. 3.4.8., Tab. 3-5, Ansätze 2 u. 3). Als generelle Tendenz wurde eine Verschiebung des Fettsäuremusters hin zu den längerkettigen Fettsäuren festgestellt (s. Tab. 3-5), wobei Palmitat als Hauptreaktionsprodukt der FAS-katalysierten de novo-Biosynthese beobachtet wurde. Ein gleiches Bild ergab sich nach Anreinigung der C.cohnii-Synthetase durch Ammoniumsulfatfraktionierung mit anschließender Sepharose-6B-Gelfiltration, durch zweimalige, jeweils 14stündige Ultrazentrifugation bei 100000xg (nach LYNEN, 1969) sowie durch Gelfiltration des Ausgangsmaterials (2. 100000xg-Überstand, s. 3.4.8.) über Sephadex G-100. Stets war die Verschiebung des Musters der neugebildeten Fettsäuren zum längerkettigen Bereich des Spektrums hin zu beobachten (s. 3.4.7., Tab. 3-4 und Abb. 3-8,B sowie 3.4.8., Tab. 3-5, Ansätze 4 und 5) , ein Effekt, der bei der Reinigung der S.cerevisiae-FAS nicht auftrat (s. 3.4.8., Abb. 3-8,C und Tab. 3-4,C). Hier waren Endproduktmuster von 100000xg-Überstand und gereinigtem Enzym identisch. Mit gereinigter C.cohnii-FAS war zum ersten Mal auch signifikanter Einbau von Radioaktivität in $C_{20:0}$ und $C_{22:0}$ zu registrieren (Tab. 3-5). Bei nach 3.6.8. isoliertem Enzym ließ sich eine ähnliche Produktverteilung feststellen (s. 3.7.5., Tab. 3-20), wobei Palmitat - wie schon nach Konzentrierung oder Anreinigung des 100000xg-Überstands - Hauptreaktionsprodukt war. Bei den Fettsäuren mit längerer Kohlenwasserstoffkette

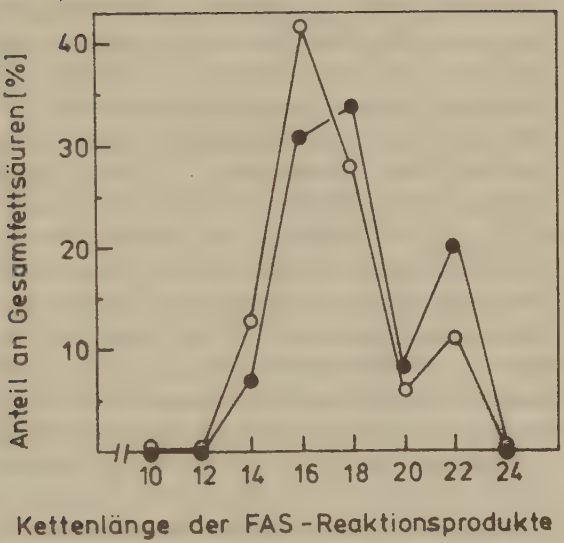


Abb. 4-1: Zweigipfligkeit des Fettsäuremusters der von gereinigter C.cohnii-FAS synthetisierten Produkte (Daten aus 3.7.5., Tab. 3-20).

o—o : Kettenlängenprofil der FAS-Reaktionsprodukte bei 75 µg Enzymprotein pro Ansatz;

●—● : Kettenlängenprofil der FAS-Reaktionsprodukte bei 200 µg Enzymprotein pro Ansatz.

als $C_{18:0}$ zeigte $C_{22:0}$ stets eine höhere Markierung (2-4 fach) als die $C_{20:0}$-Säure, so daß sich hier - in Analogie zu der Typ-I-Synthetase aus Mycobacterium smegmatis (BRINDLEY et al., 1969; VANCE et al., 1973; BLOCH, 1975 und 1977) ein zweigipfliges Fettsäuremuster ausbildet ("bimodial pattern").
Dieses doppelgipflige Fettsäuremuster angereinigter (Tab. 3-5) bzw. gereinigter C.cohnii-FAS (Tab. 3-20) verstärkte sich noch durch Erhöhung der Enzymkonzentration im Inkubationsansatz (3.7.5., Tab. 3-20, s.a. Abb. 4-1).

Palmitat und Stearat waren jedoch stets als Hauptreaktionsprodukte vertreten, wie bei den meisten bisher untersuchten Fettsäuresynthetasen (STOOPS et al., 1977). Die Zweigipfligkeit des von gereinigter C.cohnii-FAS hergestellten Endproduktmusters könnte - in Analogie zu den bei der de novo-Biosynthese von Fettsäuren in laktierenden Brustdrüsen beobachteten Vorgängen (KNUDSEN & DILS, 1975; KNUDSEN et al., 1976; LIBERTINI & SMITH, 1978 und 1979; SMITH & LIBERTINI, 1979; CHATTERJEE et al., 1979; KNUDSEN, 1979) - auf der Abtrennung einer kettenlängenspezifischen Thioesterase während der Isolierungsprozedur beruhen, welche nicht mit dem C.cohnii-FAS-Komplex assoziiert ist. ^{14}C-Einbau in Ölsäure ($C_{18:1}$) sowie in Docosahexaensäure ($C_{22:6}$) war mit Hilfe der analytischen Radiogaschromatographie in keinem der untersuchten Fälle festzustellen. Die Möglichkeit, daß die C.cohnii-FAS selbst zur Einführung von Doppelbindungen in die wachsende Acylkette befähigt sein könnte, muß daher nach den vorliegenden Daten ausgeschlossen werden.

Versuche zur Steigerung der sehr geringen spezifischen Aktivität der C.cohnii-FAS (vergleiche Aktivitäten der C.cohnii- und der S.cerevisiae-FAS, Tab. 3-18 aus 3.6.8. und Tab. 3-9 aus 3.5.5.) wurden sowohl im 100000xg-Überstand (s. 3.4.) wie vor allem mit nach 3.6.8. gereinigtem Enzym (s. 3.8.) durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß bei -20°C aufbewahrte Enzymproben erst durch Voriinkubation (30 min bei 22°C) in DTE-haltiger Pufferlösung (s.a. 2.7.8.1.) aktiviert werden mußten, um möglichst gute Syntheseausbeuten zu erzielen (s. 3.8.1., Abb. 3-30). Ähnliches wurde auch für Fettsäuresynthetasen aus anderen Organismen beschrieben (SMITH & ABRAHAM, 1970 und 1975; MUESING & PORTER, 1975; NEPOKROEFF et al., 1975). Positive Beeinflussung der FAS-Aktivität ergab sich ebenfalls durch 5 mM DTE im Test (s. 3.4.4. und 3.8.2.), welches als SH-Schutzreagenz für die Reduzierung der offensichtlich an der Katalyse beteiligten SH-Gruppen des Enzyms sorgte (vergl. LYNEN, 1969; KATIYAR & PORTER, 1977; STOOPS et al., 1977).

Bei Inkubationen in Kaliumphosphat-Puffer zeigte sich eine deutliche Beeinflussung der Aktivität durch die Ionenstärke des Puffers (3.8.3., Abb. 3-32). Während hohe Puffermolaritäten (0.3 und 0.4 M) nur eine leicht hemmende Wirkung ausübten, war die FAS-Aktivität in <0.05 M K-PO_4 drastisch reduziert, obwohl der pH-Wert konstant blieb. Bei Inkubation in Tris-HCl-Puffer (s. Standardansatz, 2.7.8.1.) ließ sich die FAS-Aktivität durch Zusatz von NaCl bzw. KCl in einem relativ engen Konzentrationsbereich steigern (s. 3.8.4., Abb. 3-33). Höchste Aktivitäten wurden mit 50 mM NaCl bzw. 0.1 M KCl erreicht, wohingegen eine weitere Erhöhung der Salzkonzentration zu einem raschen Abknicken des Aktivitätsprofils führte. Dabei ließ sich durch KCl-Zusatz eine deutlich bessere FAS-Aktivität erzielen als durch NaCl-Zusatz. Den routinemäßigen Enzymbestimmungen wurde daher 0.1 M KCl schon während der Vorinkubation des Enzyms zugesetzt (s. 2.7.8.1.). Ein positiver Einfluß von KCl-Zusätzen auf die Stabilität tierischer FAS-Komplexe wurde von BUCKNER & KOLATTUKUDY (1976) beobachtet. Dieser "KCl-Effekt" war besonders deutlich bei Aufbewahrung bzw. Inkubation von Fettsäuresynthetasen in leicht alkalischem Milieu (MUESING & PORTER, 1975). Abhängigkeit der FAS-Aktivität wie der Haltbarkeit des Enzyms von der Ionenstärke des Test- bzw. des Aufbewahrungspuffers ist für Fettsäuresynthetasen aus anderen Organismen vielfach dokumentiert (HSU et al., 1965; YANG et al., 1967; BRINDLEY et al., 1969; KNOCHE & KOTHS, 1973; VANCE et al., 1973; KAWAGUCHI & OKUDA, 1977). Wie die meisten bekannten FAS-Systeme benötigt auch die C.cohnii-FAS zum Erreichen guter spezifischer Aktivitäten 0.1 M K-PO_4-Puffer oder - bei Verwendung von Tris-HCl-Puffer - den Zusatz von 0.1 M KCl zum Inkubationsmedium.

Von vielen FAS ist bekannt (besonders von pro- und eukaryotischen mikrobiellen Synthetasen, vergl. LYNEN, 1969; GOLDBERG & BLOCH, 1972; KNOCHE & KOTHS, 1973; ROSSI & CORCORAN, 1973; VANCE et al., 1973), daß sie FMN im Enzymkomplex gebunden haben oder FMN-Zusatz zum Testansatz zur Entfaltung optimalen enzymatischen Umsatzes benötigen. Für die Fettsäuresynthetase aus C.cohnii konnte

eine Aktivitätssteigerung durch FMN-Gabe nicht festgestellt werden (s. 3.8.5., Abb. 3-34). Es wurde im Gegenteil eine Hemmung des enzymatischen Umsatzes schon bei geringen FMN-Konzentrationen (0.1 µM) beobachtet.

Auch durch freies CoASH ist die FAS-Reaktion in vielen Organismen beeinflußbar (HSU et al., 1965; KHAN & KOLATTUKUDY, 1973; BLOCH, 1975; GIOMPRES & PACKTER, 1978). Zumeist ist hierbei eine Hemmung zu beobachten. Da das Vorhandensein geringer Mengen an freiem Coenzym A in den selbst synthetisierten und über mehrere Monate lang aufbewahrten Acetyl- bzw. Malonyl-CoA-Präparaten nicht völlig ausgeschlossen werden konnte, wurde die Empfindlichkeit der C.cohnii-FAS für CoASH überprüft (s. 3.8.6., Abb. 3-35). Eine knapp 20%ige Hemmung der de novo-Biosynthese war bei Konzentrationen zwischen 10 und 100 µM CoASH zu beobachten, die in diesem Konzentrationsbereich nahezu konstant blieb. Damit erwies sich die C.cohnii-FAS als relativ unempfindlich gegen freies Coenzym A (vergl. GIOMPRES & PACKTER, 1978). Eine Steigerung der Aktivität (s. bei BLOCH, 1975, bei 50 µM CoASH) bzw. eine Bedürftigkeit der Terminationsreaktion für CoASH, wie kürzlich von LINN et al. (1980) bzw. LINN & SRERE (1980) für die FAS aus Rattenleber postuliert, konnte allerdings ebensowenig nachgewiesen werden.

Die in den Standardansätzen enthaltenen Mengen an Rinderserumalbumin (BSA) und EDTA bewirkten nur eine unwesentliche Steigerung der Enzymaktivität (s. 3.8.7.,um 5%), wurden jedoch als Proteaseschutzsubstanz - bzw. Proteasesubstrat - den Routinetests hinzugefügt. Zusatz von E.coli-ACP führte bei Vorhandensein von 1 bzw. 2 mM DTE im Inkubationsmedium zu einer 30-40%igen Steigerung des enzymatischen Umsatzes, sowohl beim 100000xg-Überstand als auch beim gereinigten Enzym (s. 3.8.7.). Dieser Effekt konnte bei Anwesenheit von 5 mM DTE im Test nicht mehr gezeigt werden. Da es sich bei 1 bzw. 2 mM DTE im Ansatz um für die C.cohnii-FAS suboptimale Konzentrationen handelt (vergl. 3.4.4., Abb. 3-6, und 3.8.2., Abb. 3-31), dürfte die nur bei diesen DTE-Konzentrationen beobachtete Aktivitätssteigerung durch Zugabe von E.coli-ACP eher

auf einen "SH-Schutzeffekt" als auf eine echte ACP-Abhängigkeit des Enzyms zurückzuführen sein.

Veränderungen physikalischer Parameter, wie langsames Schütteln der Testansätze im temperierten Wasserbad oder Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 30 bzw. 37°C, bewirkten bei gereinigter C.cohnii-FAS eine Reduzierung des enzymatischen Umsatzes (um 10-20% bei 30°C bzw. 40-60% bei 37°C; um 20-50% bei verschieden starkem Schütteln im 25°C-Wasserbad). Die beim Schütteln der Inkubationsansätze beobachteten Aktivitätsverluste dürften vor allem auf die auch bei der Isolierung des Enzyms festgestellte Empfindlichkeit der C.cohnii-FAS gegenüber mechanischen Scherkräften beruhen.

4.4. REINIGUNG DER FETTSÄURESYNTHETASE AUS S.CEREVISIAE

Um ein typisch eukaryotisches Vergleichsenzym für die molekulare Charakterisierung und Klassifizierung der C.cohnii-FAS in Händen zu haben, wurde die besonders von LYNEN und Mitarbeitern, der Arbeitsgruppe um SCHWEIZER sowie derjenigen um WAKIL eingehend studierte Fettsäuresynthetase aus S.cerevisiae (vergl. LYNEN, 1969; KÜHN et al., 1972; SCHWEIZER et al., 1973; ARNSTADT et al., 1975; STOOPS et al., 1975, 1978a; STOOPS & WAKIL, 1978; WIELAND et al., 1979) gereinigt. Hierzu wurde in dieser Arbeit ein neues Verfahren entwickelt (s. 3.5.1. bis 3.5.4.).

Im Vergleich zu den herkömmlichen Isolierungsmethoden der Hefe-FAS (s. Tab. 4-2) wurden folgende Neuerungen eingeführt:

a) Ausgangsmaterial war partikelfreier 100000xg-Überstand;
b) auf die Adsorption der Synthetase an Calciumphosphatgel wurde aus Gründen einer möglichen Aktivierung endogen vorhandener Proteasen (HARDIE & COHEN, 1978) verzichtet;
c) die Calciumphosphatgel-Adsorption wurde durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose (DE-52) ersetzt;

Tab. 4-2: Vergleich der in der vorliegenden Arbeit benutzten Reinigungsprozedur für die *S.cerevisiae*-FAS mit den in der Literatur beschriebenen Methoden

Literaturstelle	Ausgangsmaterial für die Enzymreinigung	Reinigungsschritte	Spezif. Akt. des gereinigten Enzyms (mU/mg)	Ausbeuten
A) LYNEN (1969)	Rohhomogenat nach Zellaufschluß	1. Ammoniumsulfatfraktionierung und Dialyse; 2. Calciumphosphatgel-Adsorption; 3. Ammoniumsulfatfraktionierung; 4. zweimalige, 6stündige Ultrazentrifugation bei 100000xg; 5. Hydroxylapatit-Chromatographie.	1500-2500	39%; ca. 1 g Enzym aus 8 kg Zellen
B) KÜHN et al. (1972); SCHWEIZER et al. (1973)	Rohhomogenat nach Zellaufschluß	1. s. A),1.; 2. Calciumphosphatgel-Behandlung(keine FAS-Bindung); 3. Ammoniumsulfatfällung; 4. s. A),4.; 5. 15stündige Zentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten	490;530	10-20 mg Enzym aus 200 g Zellen
C) STOOPS et al.(1978a)	8000xg-Überstand des Rohhomogenats	1. Ammoniumsulfatfraktionierung und Dialyse; 2. s. B),2.; 3. s. B),3.; 4. Ultrazentrifugation (s.o.) über Nacht; 5. 6stündige Ultrazentrifugation (s.o.); 6. 6stündige Dialyse des resuspendierten Sediments; 7. DEAE-Bio·Gel-A-Chromatographie; 8. 6stündige Ultrazentrifugation (s.o.).	1000-2000	12%
D) vorliegende Arbeit	100000xg-Überstand	1. Ammoniumsulfatfraktionierung(und Dialyse); 2. Chromatographie an DEAE-Cellulose; 3. Ammoniumsulfatfällung(und Dialyse); 4. Sepharose-6B-Gelfiltration.	1400-1900	10-18%; 4-10 mg Enzym aus 150 g Zellen

Bei nach Schritt 4. (s.A) bereits sehr aktivem Enzym (um 1800 mU/mg) erübrigt sich Schritt 5.

In Klammern gesetzte Reinigungsschritte (s. D) können ggf. zwecks schnellerer Durchführung der Präparation entfallen.

d) die bisher als abschließender Reinigungsschritt verwendete jeweils 6stündige und mehrfach wiederholte Ultrazentrifugation und/oder Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation wurde durch eine zeitlich kürzere und schonendere Gelfiltration an Sepharose CL-6B bzw. 6B ersetzt.

Die so aus 100-150 g Zellmaterial gewonnene Fettsäuresynthetase zeigte im nativen Gradientengelsystem nach RÜCHEL & GROSS (1979) eine Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von 2.3×10^6 Dalton (s. 3.5.5.-3.5.7. Abb. 3-11 und 3-13) und in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen nach LÄMMLI (1970) sowie in SDS/Harnstoffgelen (n. 2.10.4.) zwei Banden mit einem Molekulargewicht von 205000 und 213000 Dalton (Abb. 3-12 und 3-14). Diese Werte liegen in der Größenordnung der von LYNEN (1969), SCHWEIZER et al. (1973) sowie STOOPS et al. (1975, 1978a) gefundenen Molekulargewichte des nativen bzw. in Untereinheiten zerlegten Enzymkomplexes. Die spezifische Aktivität der nach dem in 3.5. beschriebenen Verfahren gereinigten Hefe-FAS betrug bei sechs durchgeführten Präparationen zwischen 1400 und 1900 mU/mg, entsprechend dem Umsatz von 1400-1900 nMol Malonyl-CoA/min x mg bei 30°C (s. 3.5.5.). Die erhaltene spezifische Aktivität des Enzympräparates hängt dabei vom Status der Hefe-Zellen ab (frisch geerntete und sofort verarbeitete Zellen enthalten FAS mit höherer Aktivität) sowie von der Schnelligkeit der Präparation (je länger der für die Reindarstellung des Enzyms benötigte Zeitraum, desto schlechter die letztendlich erhaltene spezifische Aktivität). Dies wurde bereits von LYNEN (1969) beobachtet. Der Malonyl-CoA-Umsatz des gereinigten Enzyms läßt sich darüber hinaus durch 30minütige Vorinkubation im kompletten Testansatz (ohne Substrate; vergl. 2.7.7.2.) bei Raumtemperatur bzw. bei 30°C um weitere 5-10% steigern.

Die mit Hilfe dieser neuen Reinigungsprozedur erzielten spezifischen Aktivitäten liegen in der Größenordnung der meisten in der Literatur beschriebenen Werte (LYNEN, 1969; STOOPS et al., 1975, 1978a) und sind deutlich höher als die von SCHWEIZER und Mitarbeitern publizier-

ten Daten (490 und 530 mU/mg; KÜHN et al., 1972; SCHWEIZER et al., 1973).
Die Dauer der in 3.5. beschriebenen Isolierungsprozedur betrug - je nach Menge des Ausgangsmaterials - zwischen 40 und 48 h. Diese Zeit kann noch verkürzt werden: a) durch Wegfallenlassen der 6stündigen Dialyse nach der Ammoniumsulfatfraktionierung (s. 3.5.2.), wobei die Proteinsedimente in einem größeren Puffervolumen resuspendiert werden müssen, bevor sie auf die DE-52-Säule aufgetragen werden (vergl. 3.6.5.); und b) durch Verwendung von bei -20°C aufbewahrtem 100000xg-Überstand als Ausgangsmaterial der Präparation. Dieser Überstand zeigte bei Lagerung bis zu 3 Monaten keinen nennenswerten Aktivitätsverlust (maximal 4-7% der Ursprungsaktivität).
Die in der vorliegenden Arbeit erstellte, wesentlich vereinfachte Reinigungsprozedur für die Fettsäuresynthetase aus S.cerevisiae erbrachte somit ein homogenes Enzym bei mit den Literaturwerten vergleichbarer spezifischer Aktivität und Ausbeute (s. STOOPS, 1978a). Die erhaltenen Enzympräparate waren aus diesen Gründen als 'Vergleichs-FAS' für die Reinigung und Charakterisierung der Fettsäuresynthetase aus C.cohnii geeignet.

4.5. REINIGUNG DER FETTSÄURESYNTHETASE AUS C.COHNII

Auf Grund der cytoplasmatischen Lokalisierung des Acetyl- und Malonyl-CoA-abhängigen de novo-Biosynthesesystems der Fettsäuren (s. 3.3.) wurde der partikelfreie 100000xg-Überstand als Ausgangsmaterial für Versuche zur Reinigung der C.cohnii-FAS benutzt (s. 3.6.). Aus frisch geernteten wie aus bis zu 3 Monaten bei -20°C gehaltenen C.cohnii-Zellen gewonnene 100000xg-Überstände zeigten nahezu gleiche FAS-Aktivitäten (s. 3.6.1.). Erst bei 9 Monate lang so aufbewahrten Zellen machte sich eine deutliche Reduzierung (um 40%)der Synthetase-Aktivität bemerkbar. In den nach erfolgtem Zellaufschluß durch differentielle Zentrifugation erhaltenen 100000xg-Überständen, die für die Charakterisierung der Fettsäurebiosynthese (s. 3.4.) sowie die Reinigung der C.cohnii-

FAS (s. 3.6.1. - 3.6.8.) Verwendung fanden, ließ sich keine mitochondriale 2-Enoyl-CoA-Hydratase-Aktivität nachweisen. Es wurde daher davon ausgegangen, daß die Mitochondrien während des Zellaufschlusses intakt blieben und die verwendeten Überstände der Ultrazentrifugation frei waren von die de novo-Biosynthese störenden ß-Oxidationsenzymen (s. 3.6.1.).

Es wurde lange Zeit versucht, die Isolierung der C.cohnii-FAS analog zu dem sich für die Reinigung des Hefeenzyms als erfolgreich erwiesen habenden Verfahrens (s. 3.5. und 4.4.) durchzuführen. Dieses Vorgehen führte jedoch aus verschiedenen Gründen nicht zu befriedigenden Ergebnissen, was im folgenden ausführlich dargelegt werden soll.

Bei der Fraktionierung des 100000xg-Überstands mit flüssigem Ammoniumsulfat (s. 3.6.2.) erfolgte zwar eine 2.5- bis 3.5-fache Anreinigung der Fettsäuresynthetase (s. Tab. 3-10), ein mindestens 35%iger Verlust an Gesamtaktivität ließ sich jedoch nicht vermeiden, auch nicht bei Erfüllung sämtlicher Vorsichtsmaßnahmen (s. 3.6.2.). Das resuspendierte und dialysierte Proteinsediment der 51%-$(NH_4)_2SO_4$-Fällung beinhaltete eine ausgesprochen instabile Fettsäuresynthetase, die, bei 0°C oder +4°C aufbewahrt, innerhalb von 3 Tagen rund 50% ihrer Aktivität verlor (s. 3.6.2.). Dieser starke Aktivitätsverlust ließ sich auch durch den Zusatz von Proteasehemmern nur unwesentlich hinauszögern. Als Hauptgrund für die gefundene Instabilität des Enzyms dürfte die Aktivierung endogen vorhandener, evtl. durch den Zellaufschluß aus beschädigten Lysosomen freigesetzter Proteasen anzusehen sein, die als Folge der Ammonsulfatfällung auftritt (s. 3.6.3.1., Tab. 3-11 und 3-12). Aktivierung von Proteasen durch $(NH_4)_2SO_4$ wird auch als Ursache der Instabilität von Phosphorylase-Phosphatase-Präparationen aus Kaninchen-Skelettmuskel vermutet (P.A. DJOVKAR & L.M.G. HEILMEYER, jr., persönliche Mitteilung). Anfälligkeit von Fettsäuresynthetase-Komplexen aus diversen Organismen gegenüber endogenen, evtl. FAS-assoziierten Proteasen wurde bereits des öfteren beobachtet (SCHWEIZER et al., 1973; STOOPS et al., 1975, 1977, 1978a,b;

BUCKNER & KOLATTUKUDY, 1976). Normalerweise wird daher den benutzten Pufferlösungen EDTA, Benzamidin und/oder PMSF als Proteasenhemmstoff zugesetzt (STOOPS et al., 1978a,b; SCHWEIZER et al., 1973; GIOMPRES & PACKTER, 1978; WOOD et al., 1978; PACKTER & ALAM, 1980). Im allgemeinen kann durch diese Maßnahme proteolytischer Angriff der Fettsäuresynthetasen verhindert werden, nicht so bei der C.cohnii-FAS. Das 51%-Ammoniumsulfatsediment, das auch die FAS beinhaltete, enthielt zwar nur 1/4 der in den einzelnen Fraktionen vorhandenen Protease-Aktivität (s. 3.6.3.1., Tab. 3-11 und 3-12), diese ließ sich jedoch auch durch die wirksamste Hemmstoffkombination aus 3 mM EDTA, 2 mM Benzamidin und 1 mM PMSF (s. 3.6.3.2., Tab. 3-13) nicht vollständig unterdrücken. Die Benötigung aller drei Hemmsubstanzen für eine möglichst gute Proteasenunterdrückung deutet auf das Vorhandensein von verschiedenen Proteasen in C.cohnii-Zellextrakten hin.

Die der Ammoniumsulfatfraktionierung nachfolgende Chromatographie an DE-52 konnte die Proteasen nicht von der Fettsäuresynthetase abtrennen (s. 3.6.4.). Darüberhinaus wurde die C.cohnii-FAS unter keiner der unter 3.6.4. aufgeführten Variationen der Chromatographiebedingungen zu mehr als 60% an das Gelmaterial gebunden. Es erfolgte im Gegenteil eine Aufspaltung der Synthetase-Aktivität zwischen Durchlauf und Eluat der Säule, wobei beide Fraktionen annähernd gleiche spezifische wie Gesamtaktivität aufwiesen (s. 3.6.4., Abb. 3-16 und Tab. 3-14) und in erhöhtem Maße (im Vergleich zum dialysierten 51%-Ammoniumsulfatsediment) proteolytische Aktivität zeigten. Daß es sich bei diesem 'splitting' der FAS-Aktivität um eine mögliche Trennung zweier verschiedener Fettsäuresynthetasen handelte, muß jedoch als unwahrscheinlich angesehen werden. Beide FAS-Fraktionen zeigten sowohl gleiches pH-Profil, Unabhängigkeit von zugesetztem E.coli-ACP als auch ein identisches Endproduktmuster. Eine Erhöhung der spezifischen Aktivität des an die Säule gebundenen FAS-Anteils ließ sich erwartungsgemäß durch Elution mittels Phosphatpuffer-Gradienten erreichen (s. 3.6.4., Abb. 3-17 und Tab. 3-15), jedoch

zeigten auch hier die Eluatfraktionen gesteigerte Proteaseaktivität. Eine Trennung von Proteasen und Fettsäuresynthetase durch Gradientenelution gelang somit nicht. Die erhöhte proteolytische Aktivität beeinflußte die FAS-Aktivität bzw. die Haltbarkeit der durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose gewonnenen FAS-Fraktionen in besonderem Maße. So war ohne den Zusatz der o.a. Hemmstoffkombination (s.a. 3.6.3.2.) eine Abnahme der im Durchlauf wie im Eluat der Säule enthaltenen FAS-Aktivität um rund 50% innerhalb eines Tages bei Aufbewahrung bei 0-4°C zu verzeichnen. Proteinproben mit einem derartigen Aktivitätsverlust zeigten im nativen Polyacrylamidgradientengel entweder eine Zunahme niedermolekularer Banden auf Kosten der eigentlichen FAS-Bande (s. 3.6.8., Abb. 3-23) oder ließen überhaupt keine Bandierung mehr erkennen. Dieser Protease-Effekt auf das im Polyacrylamidgel erhaltene Bandenmuster wurde auch von anderen Autoren für Fettsäuresynthetasen aus verschiedenen Spezies beobachtet (STOOPS et al., 1975, 1978a,b; BUCKNER & KOLATTUKUDY, 1976).

Auf Grund der in 3.6.2. bis 3.6.4. dargelegten Fakten wurde vor einer weiteren Reinigung der C.cohnii-FAS als erstes versucht, die störende proteolytische Aktivität von der Synthetase zu trennen. Dabei erwiesen sich zwei Verfahren als erfolgreich:

1. die Affinitätschromatographie proteasehaltiger Enzymsuspensionen an Casein-Sepharose 4B (modifiziert nach SPERLING et al., 1979; s.a. 2.18.4.) und
2. Die Chromatographie von FAS und Proteasen enthaltendem Material an DEAE-Sephadex A25 nach 2.18.2.

Bei der Affinitätschromatographie an Casein-Sepharose wurden die Proteasen vollständig an das Gelmaterial gebunden (s. 3.6.3.3., Abb. 3-15), während sämtliche FAS-Aktivität im Durchlauf der Säule wiedergefunden wurde. Die adsorbierten Proteasen konnten anschließend mit 2.5 M KCl enthaltendem Säulenpuffer wieder eluiert werden.

Als noch günstiger erwies sich die in 3.6.5. dargestellte Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex. Durch diese Methode gelang es, sowohl FAS und Proteasen vollständig voneinander zu trennen (s. Abb. 3-18) als auch einen großen Teil des Fremdproteins zu entfernen (s. Abb. 3-18 und Tab. 3-16). Aus diesen Gründen konnte für die Reinigung der C.cohnii-FAS auf den zusätzlichen Affinitätschromatographieschritt (s.o.) verzichtet werden. Bei der Chromatographie an DEAE-Sephadex trat die zuvor mit DEAE-Cellulose beobachtete Aufteilung der FAS-Aktivität in zwei annähernd 'gleichwertige' Fraktionen (Durchlauf und Eluat, s. 3.6.4.) nicht auf. Die Hauptmenge an FAS-Aktivität war stets im Durchlauf der Säule zu finden (> 80%), der in keinem der untersuchten Fälle Protease-Aktivität aufwies. Die Anreinigung der C.cohnii-FAS durch Chromatographie an DEAE-Sephadex betrug beim Auftrag von resuspendiertem 51%-Ammoniumsulfatsediment des 100000xg-Überstands zumeist 4-5fach, bei einer Ausbeute von 65-80% der aufgegebenen Aktivität (3.6.5., Tab. 3-16). Die Anreicherung des Enzyms bei direkt appliziertem 100000xg-Überstand, was zur Vermeidung der Proteasenaktivierung durch die Ammoniumsulfatfällung (s. 3.6.3.1.) vorgenommen wurde, betrug im allgemeinen 10 bis 16fach bei leicht geringerer Ausbeute (50-65%, s. Tab. 3-18).

Da die die Fettsäuresynthetase beinhaltenden Durchläufe der DEAE-A25-Säulen durch anschließende Gelfiltration über Sepharose 6B, CL-6B oder 4B (s. 3.6.7.) noch nicht von allem Fremdprotein zu reinigen waren, wurde als weiterer Reinigungsschritt - vor der Gelfiltration - eine Adsorption der FAS an Hydroxylapatit durchgeführt (s. 3.6.6.). Diese, der oftmals publizierten Calciumphosphatgel-Adsorption (LYNEN, 1969; HSU et al., 1969; KÜHN et al., 1972; SCHWEIZER et al., 1973; MUESING & PORTER, 1975; NEPOKROEFF et al., 1975; SMITH & ABRAHAM, 1975; STOOPS et al., 1978a) sehr ähnliche Methode resultierte in einer weiteren Reinigung des Enzyms (3.5 bis 5.5fach) bei einer Ausbeute um 60% (s. 3.6.6., Tab. 3-17). Die FAS-Aktivität aus Durchläufen der DEAE-

Sephadex-Säulen (s.o.) konnte unter den in 3.6.6. angegebenen Bedingungen vollständig an das Gelmaterial gebunden werden (s. Abb. 3-19) und war durch einen Tris-HCl/Kaliumphosphat-Gradienten wieder zu eluieren. Dabei wurde die FAS-Aktivität mit einer leichten Verzögerung zum Hauptanteil des gebundenen Proteins von der Gelmatrix abgelöst (vergl. Abb. 3-19). Die Fraktionen mit der höchsten spezifischen FAS-Aktivität eluierten zwischen 0.15 und 0.25 M K-PO_4. Bis zu einer Kaliumphosphat-Konzentration von 0.12 M wurden bereits 50-70% des insgesamt an die Säule gebundenen Proteins eluiert, jedoch nur 1-2% der insgesamt wiedergefundenen FAS-Aktivität. Sämtliche Fraktionen der Hydroxylapatit-Chromatographie waren bei Auftrag von proteasefreien DEAE-Sephadex-Durchläufen ebenfalls frei von proteolytischer Aktivität. Der Adsorptionsschritt an Hydroxylapatit ergab zum Teil, wie durch native bzw. SDS-Gelelektrophorese festgestellt werden konnte, bereits homogene Enzympräparate. Dies wurde erreicht, wenn man nur die zweite, mit höheren Kaliumphosphat-Konzentrationen (> 0.18 M) eluierende Hälfte des Aktivitätsgipfels vereinigte (s. Abb. 3-19). Ähnliches gilt für die des öfteren beschriebene Reinigung anderer Fettsäuresynthetasen über Saccharose-Dichtegradienten (NEPOKROEFF et al., 1975; KIM et al., 1977; GIOMPRES & PACKTER, 1978), wo - um reines Enzym zu erhalten - auch nur der in diesen Fällen "schwerere" Teil des Aktivitätsprofils gesammelt und vereinigt wird. Solchermaßen vereinigte und konzentrierte Fraktionen der Hydroxylapatit-Säule zeigten auf der anschließenden Sepharose-6B- oder 4B-Säule einen nahezu symmetrischen Gipfel (s. Abb. 3-22) in Bezug auf Proteinprofil und Aktivitätsprofil der FAS und ließen sich durch diesen weiteren Reinigungsschritt nur um das maximal 1.5fache anreichern, was auf eine hohe Reinheitsstufe bereits zu diesem Zeitpunkt hindeutet. Die mit > 0.18 M Phosphatpuffer eluierten Fraktionen der Hydroxylapatit-Säule zeigten auch in nativen bzw. SDS/Harnstoff-Polyacrylamidgelen eine dominierende Bande mit relativ geringer Verunreinigung durch niedermolekulare Proteine (s. 3.6.8., Abb. 3-23 und 3-24). Bei Vereinigung möglichst aller

FAS-Aktivität des Eluats war durch die nachfolgende Gelfiltration demgegenüber zumeist eine 2-4fache Anreinigung zu erzielen (s. 3.6.7.), wobei besonders Proteine mit niedrigen Molekulargewichten von der FAS abgetrennt wurden (s. Abb. 3-24). Die Verwendung der Hydroxylapatit-Chromatographie erst nach erfolgter Proteasenabtrennung durch den DEAE-Sephadex-A25-Ionenaustauscher wurde - im Gegensatz zu der ansonsten in der Literatur üblicherweise umgekehrten Aufeinanderfolge der beiden Reinigungsschritte - aus Gründen der Vermeidung von Aktivierung proteolytischer Aktivität (s. bei HARDIE & COHEN, 1978) durch Ca^{2+}-Ionen vorgenommen.

Als letzter Reinigungsschritt erfolgte - ähnlich wie bei der Fettsäuresynthetase aus S.cerevisiae (s. 3.5.4.) - die Gelfiltration des durch DEAE-Sephadex- und Hydroxylapatit-Chromatographie (an)gereinigten C.cohnii-Enzyms über Sepharose 6B/CL-6B oder Sepharose 4B (s. 3.6.7.). Dabei wurde zumeist, je nach Reinheitsgrad der aufgetragenen Proteinsuspension (s.o.), eine Anreicherung der spezifischen Enzymaktivität um den Faktor 2-4 erzielt. Bei direkter Applizierung von 100000xg-Überständen betrug die Anreicherung dagegen zwischen 4- und 8fach (s. 3.6.7.). Die Ausbeute an FAS-Aktivität schwankte dabei zwischen 50 und 90% und war, wie die letztlich erhaltene spezifische Aktivität - abhängig von einer möglichst hohen DTE-Konzentration im Säulenpuffer (mindestens 2 mM) und einer nicht zu langen Verweildauer des Enzyms auf den Gelfiltrationssäulen. Langsame Durchflußraten (16 ml/h und weniger) führten zwar zu einer besseren Auftrennung der einzelnen Proteine, resultierten bei der Reinigung der C.cohnii-FAS jedoch in bis zu 50%igem Verlust an Gesamtaktivität. Dieser Aktivitätsverlust konnte teilweise durch Benutzung von Säulenpuffern, die bis zu 5 mM DTE enthielten, aufgefangen werden. Aus Gründen der Rückgewinnung möglichst guter Ausbeuten und der Erzielung hoher spezifischer Aktivitäten wurden daher für die routinemäßigen Enzymreinigungen die in 2.19.2. und 2.19.3. bzw. in 3.6.7. angegebenen, größeren Durchflußraten verwendet, bei einer DTE-Konzentration im Säulenpuffer von 2 mM.

Die Hauptmenge an FAS-Aktivität eluierte zumeist im oder leicht versetzt zum Elutionsvolumen von Ferritin (4.5 x 10^5 Dalton) wie in Abb. 3-20 bis 3-22 gezeigt wird, und war bei Gelfiltrationen von 100000xg-Überständen dem Hauptproteingipfel zumeist zum höhermolekularen Bereich hin vorgelagert (Abb. 3-20,A; 3-22,A). Einen deutlichen Einfluß auf das Aktivitätsprofil der C.cohnii-FAS zeigte das Vorhandensein von Proteinasen in der auf die Gelfiltration aufgegebenen Proteinsuspension (vergl. Abb. 3-20,B, Abb. 3-21,A-C mit Abb. 3-20,A und C sowie Abb. 3-22,A und B). Festzustellen war dabei stets eine leichte Verschiebung des FAS-Profils zum niedermolekularen Bereich hin. Außerdem war hier auch in Fraktionen mit einem größeren Elutionsvolumen als LDH (<140000 Dalton) noch signifikante FAS-Aktivität nachweisbar. Diese Effekte traten bei der Gelfiltration von proteasefreien Enzymsuspensionen nicht auf und dürften daher auf eine teilweise Verdauung der C.cohnii-FAS durch die endogenen Proteinasen hinweisen, wobei - unter den Bedingungen des optimierten Enzymtests nach 2.7.8.1. - selbst proteolytisch angedaute Polypeptide noch (2-^{14}C)-Malonyl-CoA-Einbau in langkettige Fettsäuren katalysieren konnten. Dasselbe Phänomen wurde von STOOPS et al. (1978a) für proteolytisch angedaute S.cerevisiae-FAS beobachtet.

Die Anreicherung der C.cohnii-FAS aus dem als Ausgangsmaterial dienenden, aus spätlogarithmischen Zellen gewonnenen 100000xg-Überstand betrug nach dem in 3.6.8. zusammengefaßten Verfahren zwischen 79 und 104fach (s.a. 3.6.8., Tab. 3-18), bei 4 Präparationen des Enzyms aus verschiedenen Zellzüchtungen. Die Ausbeuten beliefen sich auf 9-22% der im 100000xg-Überstand vorhandenen FAS-Aktivität. Die unter optimalen Testbedingungen (s. 2.7.8.1.) erzielbaren spezifischen Aktivitäten von so gereinigtem Enzym schwankten, je nach Güte der Präparation, zwischen 5700 und 8300 µU/mg Protein. Die Höhe der vom gereinigten Enzym gezeigten spezifischen Aktivität hing neben den bei den einzelnen Reinigungsschritten zu beachtenden Vorsichtsmaßnahmen (s. 3.6.1. bis 3.6.7.) und einer möglichst schnellen Präparations-

durchführung auch von der im 100000xg-Überstand vorhandenen FAS-Aktivität ab. Es zeigte sich, daß bei völlig gleicher Durchführung der Reinigungsprozedur die erzielte spezifische Aktivität des homogenen Enzyms umso höher war, je höher die spezifische Aktivität des 100000xg-Überstands lag. Diese Abhängigkeit wurde auch bei der Reinigung der Fettsäuresynthetase aus Kaninchenbrustdrüsen beobachtet (CAREY & DILS, 1970). Die von der gereinigten C.cohnii-FAS gezeigten Umsatzraten waren etwa 2-3fach niedriger als die des 100000xg-Überstands aus der Hefe S.cerevisiae und rund 250fach niedriger als die der gereinigten Hefe-Synthetase (vergl. 3.5.4., Tab. 3-8, und 3.5.5., Tab. 3-9). Worauf diese niedrige Aktivität der C.cohnii-FAS zurückzuführen war, konnte nicht geklärt werden, da alle als aktivitätssteigernd bekannten und in der vorliegenden Arbeit untersuchten Faktoren und Parameter (s. 3.8.1. bis 3.8.7.) keine derart drastische Aktivitätszunahme bewirken konnten, die den enzymatischen Umsatz durch die C.cohnii-FAS auf ein mit anderen Fettsäuresynthetasen vergleichbares Niveau angehoben hätte. FMN- bzw. CoASH-Zusatz bewirkten sogar eine Hemmung der Enzymaktivität (s. 3.8.5. und 3.8.6.). Denkbar wäre es, daß die Fettsäuresynthetase aus C.cohnii einen "endogenen Faktor" für eine optimale Aktivität benötigt, ähnlich der gereinigten FAS aus Mycobacterium smegmatis, deren Aktivität durch den Zusatz zelleigener und im Verlauf der Isolierungsprozedur abgetrennter methylierter Polysaccharide (3-O-Methyl-Mannose- und 6-O-Methyl-Glucose-haltige Polysaccharide, VANCE et al., 1973; BLOCH, 1975, 1977) enorm gesteigert werden kann. Eine Suche nach solchen endogenen Faktoren wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit aus thematischen wie zeitlichen Gründen nicht in Angriff genommen und muß weiteren Untersuchungen der C.cohnii-FAS überlassen bleiben.

Die in der vorliegenden Arbeit erstellte Reinigungsprozedur für die C.cohnii-FAS (s. 3.6.8.) resultierte im Erhalt eines homogenen Proteins, was durch die Anfärbbarkeit nur einer Bande im nativen sowie im denaturierenden (SDS- bzw. SDS/Harnstoff-)Elektrophoresesystem gezeigt werden konnte (s. 3.6.8., Abb. 3-23 und 3-24).

4.6. BESTIMMUNG DES MOLEKULARGEWICHTS DER NATIVEN C.COHNII-FAS UND IHRER UNTEREINHEITEN UND KLASSIFIZIERUNG DES ENZYMS ALS TYP-I-SYNTHETASE

Erste Ergebnisse zur annähernden Bestimmung der Größe des nativen Enzyms wurden anhand von Ultrafiltrationen der nach 3.6.8. gereinigten C.cohnii-FAS erzielt (s. 3.9.1.). Dabei befand sich die FAS-Aktivität nach der Konzentrierung über Membranen, die eine Durchlässigkeit für Proteine bis zu einem Molekulargewicht von 50000 bzw. 100000 Dalton aufwiesen, ausschließlich im Konzentrat. Bei Ultrafiltration über XM-300-Membranen war jedoch stets ein 20-35% betragender Anteil der wiedergefundenen Aktivität im Durchlauf festzustellen (Tab. 3-21). Für diesen Befund bieten sich zwei Erklärungsmöglichkeiten an:
1. die C.cohnii-FAS weist ein Molekulargewicht von etwas über 300000 Dalton auf, so daß bei Konzentrierungen ein Teil des Enzyms durch die Poren der Membran in den Durchlauf entweicht, oder 2. unter den Bedingungen der Ultrafiltration (+4°C, 25 psi, Rühren durch Magnetrührer) dissoziiert ein gewisser Anteil des Enzyms in seine Untereinheiten, die kleiner als 300000, aber größer als 100000 Dalton sein müßten, und die sich daher im Durchlauf wiederfinden. Bedingung für das unter 2. Gesagte ist, daß die Untereinheiten während der Inkubation im normalen Testansatz (s. 2.7.8.1.) wieder zum aktiven Komplex reassoziieren oder daß jede Untereinheit einen kompletten Satz sämtlicher Teilaktivitäten besitzt und für sich allein aktiv sein kann.

Genauere Aussagen zur Größe des nativen Enzyms wurden anhand von Ergebnissen der Gelfiltration über Sepharose-Säulen (s. 3.9.2. und 3.6.7., Abb. 3-20 bis 3-22), der Ultrazentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten (s. 3.9.3.; Abb. 3-36,A und B) sowie der nativen Polyacrylamidgradientengel-Elektrophorese (s. 3.9.4., Abb. 3-37, und 3.9.5., Abb. 3-38) möglich. So wurde das Molekulargewicht der C.cohnii-FAS in der Gelfiltration mit 4.15×10^5, in der Ultrazentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten mit 4.1×10^5 und in der Polyacrylamidgradientengel-Elektrophorese mit 3.97×10^5 Dalton be-

stimmt (s. 3.9.2. bis 3.9.4.). Dieses Molekulargewicht liegt in der Größenordnung der tierischen Klasse-IA-Enzyme (BLOCH & VANCE, 1977; STOOPS et al., 1977), die aus zwei - wahrscheinlich identischen - Polypeptidketten zusammengesetzt sind (ARSLANIAN et al., 1976; KOLATTUKUDY et al., 1976; s.a. Kap. 1., "EINLEITUNG"). Bei den Fettsäuresynthetasen der Vertebraten lassen sich die beiden Untereinheiten in den bekannten Elektrophorese-Systemen nicht voneinander trennen (STOOPS et al., 1975, 1977, 1978b, 1979; BUCKNER & KOLATTUKUDY, 1976; VOLPE & VAGELOS, 1976; BLOCH & VANCE, 1977; GRUNNET & KNUDSEN, 1978; HARDIE & COHEN, 1978). Gleiches wurde für den FAS-Komplex aus Mycobacterium smegmatis berichtet (WOOD et al., 1978). Auch die C.cohnii-FAS zeigte in SDS- wie in den besser geeigneten (s. 2.10.4., 3.6.8. und 3.9.6.) SDS/Harnstoff-Gelen eine Bande mit einem Molekulargewicht von 178000 (± 3000) Dalton (s. Abb. 3-39, vergl. Abb. 3-24). In zwei von 16 Elektrophoresen wurde auch eine zweite Bande mit einem Molekulargewicht um 175000 Dalton festgestellt (Abb. 3-24). Daß es sich dabei um die zweite, verschieden große Polypeptidkette des C.cohnii-FAS-Komplexes handeln könnte, muß allerdings für unwahrscheinlich gehalten werden, weil diese niedermolekularere Bande in der SDS-PAGE in keinem Falle und in der SDS/Harnstoff-PAGE nur bei zwei Proben zu sehen war. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für das Bandenmuster der Homodimer-Struktur zeigenden tierischen Synthetasen beschrieben (STOOPS et al., 1975, 1978b; BUCKNER & KOLATTUKUDY, 1976). Dieser Effekt wurde von den genannten Autoren (s.a. STOOPS et al., 1977 und 1979) auf die dem gereinigten Enzym innewohnende eigenproteolytische Aktivität zurückgeführt, eine Eigenschaft, die auch von den aus zwei nicht-identischen Untereinheiten bestehenden Typ-IB-Synthetasen her bekannt ist (SCHWEIZER et al., 1973, 1978; STOOPS et al., 1975, 1978a; GIOMPRES & PACKTER, 1978). So besaß die nach 3.5. gereinigte Fettsäuresynthetase aus S.cerevisiae auch in unseren Händen die Tendenz, nach längerer Aufbewahrungszeit bei -20°C (in Pufferlösungen ohne PMSF-Zusatz) in der gelelektrophoretischen Analyse unter denaturierenden Bedingungen (n. 2.10.1. bzw. 2.10.4.)

einen Verlust der Stärke der Anfärbbarkeit der größeren A(α)-Untereinheit einhergehend mit dem Erscheinen niedermolekularer Banden zu zeigen. Bei 18 Monate lang so aufbewahrter Hefe-FAS ließ sich nur noch eine hochmolekulare Bande im SDS-Acrylamidgel nachweisen, die das apparente Molekulargewicht der B- oder ß-Untereinheit aufwies, welche offensichtlich resistent gegen proteolytischen Angriff ist (vergl. a. STOOPS et al., 1975, 1978a; SCHWEIZER et al., 1973 und 1978). Aus diesen Gründen liegt auch für die C.cohnii-FAS die Vermutung nahe, daß es sich bei dieser zweiten, nur manchmal sichtbaren niedermolekulareren Proteinbande um ein durch eigenproteolytische Aktivität der FAS bzw. durch Vorhandensein einer nicht abtrennbaren Protease in den FAS-Präparaten bedingtes Degradationsprodukt der 178000-Dalton-Untereinheit handelt. Gleiches wurde von GIOMPRES & PACKTER (1978) für die Typ-IB-Synthetase aus Aspergillus fumigatus beschrieben.

Aus dem bisher Gesagten kann daher der Schluß gezogen werden, daß die dominierende Form der nativen C.cohnii-FAS mit einem Molekulargewicht um 400000 Dalton aus zwei, in den denaturierenden Elektrophorese-Systemen nach 2.10.1. und 2.10.4. nicht trennbaren Untereinheiten zusammengesetzt ist. Ob es sich dabei, wie es für die Synthetasen aus Säugetiergeweben (GRUNNET & KNUDSEN, 1978; STOOPS et al., 1979) sowie aus Mycobacterium (WOOD et al., 1978) vermutet wird, um zwei identische, mit jeweils einem kompletten Satz aller Teilaktivitäten ausgerüstete Polypeptidketten handelt oder aber um zwei enzymatisch distinkte Untereinheiten gleichen Molekulargewichts, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Da das Molekulargewicht der C.cohnii-FAS-Untereinheiten mit 178000 Dalton jedoch deutlich unter dem für Vertebraten-FAS (GRUNNET & KNUDSEN, 1978; STOOPS et al., 1975, 1978b und 1979) um 240000 Dalton liegenden und für Mycobacterium smegmatis (WOOD et al., 1978) mit 290000 Dalton bestimmten Molekulargewicht der Untereinheiten liegt, scheint es nicht unwahrscheinlich, daß es sich bei den beiden Polypeptidketten der C.cohnii-FAS um enzymatisch verschiedene, nur vom Molekulargewicht her

identische Untereinheiten handeln könnte (vergl. a. GIOMPRES & PACKTER, 1978).

Auf Grund der fehlenden Bedürftigkeit der C.cohnii-FAS für ACP (s. 3.8.7.), der Zusammensetzung der dominierenden nativen FAS-Spezies aus zwei hochmolekularen Untereinheiten (s. 3.9.6. und 3.6.8., Abb. 3-24) sowie der Unmöglichkeit, durch die benutzten konventionellen Reinigungsmethoden (s. 3.6.2. bis 3.6.7.) die nach 2.10. und 2.11. bestimmbaren Teilaktivitäten voneinander bzw. vom Komplex zu trennen, muß die C.cohnii-FAS als typischer Vertreter der Klasse-I-Synthetasen angesehen werden. Bei den aus individuellen Komponenten bestehenden Klasse-II-Synthetasen ergibt sich demgegenüber bereits durch Gelfiltration der Enzymsuspensionen eine deutliche Trennung der verschiedenen Teilaktivitäten des de novo-Biosynthesesystems (s. HENDREN & BLOCH, 1980). Außerdem ist die Ersetzbarkeit des zelleigenen, während vorgenommener Reinigungsschritte abgetrennten Acyl-Carrier-Proteins durch E.coli-ACP vielfach dokumentiert (s. VOLPE & VAGELOS, 1976).
Ob es sich bei der C.cohnii-FAS um ein aus jeweils einer Kopie der zwei Untereinheiten nach der Formel 1A + 1B bzw. A_2 zusammengesetztes Klasse-IA-Enzym handelt (s. Kap. 1., "EINLEITUNG"), wie das Wiederfinden der Haupt-FAS-Aktivität im 400000-Dalton-Bereich nach erfolgter Sepharose-Gelfiltration bzw. Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation nahelegt, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Besonders in der Dichtegradientenzentrifugation (3.9.3., Abb. 3-36,A und B),aber auch bei manchen Gelfiltrationen (s. 3.9.2.) sowie bei der Analyse von FAS-Aktivität zeigenden Proteinbanden nach nativer Polyacrylamidgel-Elektrophorese (3.9.5., Abb. 3-38) zeigten auch höhermolekulare Aggregate signifikante FAS-Aktivität, deren Ausmaß jedoch im Vergleich zur relativ konstanten Enzymaktivität des 400000-Dalton-Komplexes von 0-40% schwankte (vergl. PACKTER & ALAM, 1980). Die Möglichkeit, daß die native C.cohnii-FAS unter anderen Bedingungen, wie Gelfiltrationen bei Raumtemperatur und/oder in anderen Pufferlösungen (mit höherer Ionenstärke bzw. unter Anwesenheit von Coenzymen oder Substraten, wodurch man den

aktivierenden Bedingungen im Standard-Inkubationsansatz, s. 2.7.8.1., näherkäme), Tendenz zur Bildung dann dominierender höhermolekularer Aggregate zeigen könnte, ist nach den Ergebnissen aus 3.9.2., 3.9.3. und 3.9.5. nicht völlig von der Hand zu weisen. Bei der Gelfiltration von 100000xg-Überständen (unbehandeltes Ausgangsmaterial) unter den in 3.6.7. angegebenen Bedingungen (s. Abb.3-20,A, 3-21,A und 3-22,A) wurde stets ein geringer, aber signifikanter Anteil der FAS-Aktivität im oder kurz hinter dem Ausschlußvolumen der Sepharose-Säulen wiedergefunden.

Auch die Möglichkeit der Dissoziation des nativen Enzymkomplexes in Untereinheiten mit halbem Molekulargewicht scheint nach den in 3.9.1. bzw. 3.9.5. beschriebenen Ergebnissen nicht unwahrscheinlich. Dissoziation nativer FAS-Komplexe in die konstituierenden Untereinheiten sowie Aggregation beider Polypeptidketten zu verschiedenen (aktiven) Subspezies nach der Formel $(A + B)_n$ ist auch für andere Klasse-IA- und -IB-Synthetasen oftmals beschrieben worden (STOOPS et al., 1975, 1978a, 1979; GIOMPRES & PACKTER, 1978; PACKTER & ALAM, 1980). Auch frühere Bestimmungen des Molekulargewichts der nativen FAS aus Kaninchenbrustdrüsen mit über 900000 Dalton (CAREY & DILS, 1970; PASKIN & MAYER, 1976), was in etwa das doppelte des heute als gültig angesehenen Molekulargewichts (515-535000 Dalton: HARDIE & COHEN, 1978; 477000 Dalton: GRUNNET & KNUDSEN, 1978) darstellt, lassen sich aus jetziger Sicht durchaus als Aggregation des nativen Enzyms (1A + 1B) zu einer doppelt so großen (2A + 2B)-Subspezies interpretieren. Ähnliches könnte sich auch - unter veränderten Reinigungsbedingungen (s.o.) - in Zukunft für die C.cohnii-FAS herausstellen.

Nach den in dieser Arbeit verwendeten Isolierungs- und Analysebedingungen und den dadurch erhaltenen Ergebnissen kann die dominierende Form des C.cohnii-FAS-Komplexes mit einem nativen Molekulargewicht um 400000 Dalton (s. 3.9.2. bis 3.9.4.) und einer Zusammensetzung aus zwei multifunktionellen Untereinheiten (2 x 178000 Dalton; s. 3.9.6.) als Klasse-IA-Synthetase, ähnlich den

Fettsäuresynthetasen der Vertebraten, angesehen werden. Damit repräsentiert die Fettsäuresynthetase aus C.cohnii den ersten bislang bekannten Vertreter eines Klasse-IA-Komplexes in niederen Eukaryonten.

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Vergleich der enzymatischen und molekularen Eigenschaften der nach 3.6.8. isolierten C.cohnii-FAS mit typischen Vertretern von Typ-I-Synthetasen aus anderen Organismen wieder.

Tab. 4-3,A

Enzymquelle	FAS-Typ	Literatur	Physikochemische Charakteristika					
			MW nativ ($\times 10^5$)	MW UE ($\times 10^5$)	Aggregation	Dissoziation (in UE)	proteolytisch angreifbar	'intrinsic' Protease
C.cohnii	I(A)	vorliegende Arbeit	3.97-4.15	2 x 1.78	+	+	++	(+)
S.cerevisiae	IB	STOOPS et al.,1978a	24	A=2.12, B=2.03	+	+	+	+
		SCHWEIZER et al.,1978	23	A=1.85, B=1.80	k.A.	k.A.	+	+
		vorliegende Arbeit	23	A=2.13, B=2.05	(+)[a]	n.f.	+	+
Mycobacterium smegmatis	IB	WOOD et al., 1978	20	2 x 2.9	k.A.	k.A.	k.A.	-
A.fumigatus	IB	GIOMPRES & PACKTER,1978; PACKTER & ALAM,1980	22.6	2 x 1.86	+	k.A.	+	(+)
Rattenleber	IA	STOOPS et al., 1979	ca. 4.25	2 x 2.2	+	+	+	-
Kaninchen-brustdrüse	IA	GRUNNET & KNUDSEN,1978; HARDIE & COHEN,1978	4.77	2 x 2.35	+[b]	+	k.A.	-
			5.15	2 x 2.52	+[b]	+	+	-
Hühnerleber	IA	STOOPS et al., 1975,1978b	4.8	2 x 2.2	-	+	+	+

k.A. = keine Angaben; n.f. = nicht festgestellt; (+) = vermutet; a = geschlossen aus z.T. in nativer Gradientengel-Elektrophorese n. 2.10.2. sichtbarer Bande vom MW um 4×10^6;
b = geschlossen aus früher publizierten Molekulargewichten von 9.1×10^5 (CAREY & DILS, 1970) bzw. 9.68×10^5 (PASKIN & MAYER, 1976); UE=Untereinheiten.

Tab. 4-3,B

Enzymquelle	FAS-Typ	Literatur	Enzymatische Eigenschaften: spez.Akt.+ (mU)	benötigte Coenzyme	pH-Optimum	K_M-Werte Ac.-CoA/M.-CoA (µM)	Endprodukte	FMN-stimulierbar
C.cohnii	I(A)	vorliegende Arbeit	5.7-8.3	NADPH + NADH	8.3	1.3/2.8	$C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{22:0}$	- (Hemmung)
S.cerevisiae	IB	vorliegende Arbeit;	1400-1900	NADPH	6.6	k.A.	$C_{16:0}$-CoA, $C_{18:0}$-CoA	k.A.
		LYNEN, 1969;	1500-2500	NADPH	6.5-7.0	28/8	$C_{16:0}$-CoA, $C_{18:0}$-CoA	+
		LYNEN et al., 1964	450	NADPH	6.5-7.5	7.3/8	$C_{16:0}$-CoA, $C_{18:0}$	k.A.
A. fumigatus	IB	GIOMPRES & PACKTER, 1978	2000-2500	NADPH	7.5	11/8.5	$C_{18:0}$-CoA	k.A.
Rattenleber	IA	NEPOKROEFF et al., 1975	600	NADPH	7.0	4.4/10	$C_{16:0}$	-
Hühnerleber	IA	ARSLANIAN & WAKIL, 1975	750	NADPH	6.7	k.A.	$C_{16:0}$	-
Kaninchen-brustdrüse	IA	DILS & CAREY, 1975	450-500	NADPH	6.6	9/29	$C_{16:0}$, $C_{4:0}$	-
Mycobacterium smegmatis	IB	BLOCH, 1975	375	NADPH+ NADH	7.0	90/9.6[a]	$C_{16:0}$-CoA, $C_{24:0}$	+

+ 1 mU = 1 nMol Malonyl-CoA/min; k.A. = keine Angaben; a = diese Werte werden von der M.smegmatis FAS nur in Gegenwart von die Enzymaktivität steigernden methylierten Polysacchariden erreicht, Ac.-CoA = Acetyl-CoA; M.-CoA = Malonyl-CoA.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Die de novo-Biosynthese der Fettsäuren in dem heterotrophen marinen Dinoflagellaten Crypthecodinium cohnii wurde zum ersten Mal im zellfreien System untersucht.

2. Das Malonyl- und Acetyl-CoA-abhängige Fettsäurebiosynthesesystem, die Fettsäuresynthetase (FAS), ist im Cytoplasma der Dinoflagellaten-Zelle lokalisiert.

3. Für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der C.cohnii-FAS wurde in dieser Arbeit ein radioaktiver Test mit (2-^{14}C)-Malonyl-CoA als Substrat entwickelt.

4. Durch die Verwendung des radioaktiven Substrats wurde es möglich, die durch die de novo-Biosynthese bereitgestellten Fettsäuren hinsichtlich ihrer Kettenlänge zu analysieren. Es zeigte sich, daß die C.cohnii-FAS - wie die meisten bisher untersuchten Fettsäuresynthetasen - hauptsächlich Palmitat ($C_{16:0}$) synthetisiert.

5. Die Endprodukte der FAS-Reaktion liegen als freie Säuren und nicht als Acyl-CoA-Ester vor, wofür die meßbare Thioesterase-Teilaktivität der C.cohnii-FAS verantwortlich zeichnet.

6. Ein aus DEAE-Sephadex-Chromatographie, Hydroxylapatit-Adsorption und Sepharose-Gelfiltration bestehendes Reinigungsverfahren wurde erarbeitet, wobei die die Stabilität und Aktivität der C.cohnii-FAS beeinträchtigenden endogenen Proteasen bereits im ersten Schritt vollständig von der Synthetase abgetrennt werden. Durch dieses Verfahren wurde die FAS um das 70- bis 100fache gereinigt.

7. So gereinigtes Enzym (spezifische Aktivität: 5700 bis 8300 µU/mg) zeigte in nativen Polyacrylamidgradientengelen eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 397000 Dalton. Mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten wurden 410000 und durch Gelfiltration 415000 Dalton gefunden.

8. Analysen des gereinigten Enzyms durch SDS/Harnstoff-Polyacrylamidgel-Elektrophorese zeigten, daß der native Enzymkomplex aus zwei nicht-trennbaren Untereinheiten mit einem apparenten Molekulargewicht von 178000 Dalton zusammengesetzt ist. Die Fettsäuresynthetase aus C.cohnii stellt somit einen typisch eukaryontischen, aus sog. "multifunktionellen Polypeptiden" zusammengesetzten FAS-Komplex dar.

9. Die gereinigte C.cohnii-FAS wurde in Bezug auf pH-Optimum, Coenzym und Substratabhängigkeit sowie Endproduktmuster charakterisiert. Die Einflüsse verschiedener, exogen zugesetzter Faktoren auf die Aktivität des Enzyms wurden untersucht und mit den im partikelfreien 100000xg-Überstand erhaltenen Daten verglichen.

10. Für die gut charakterisierte Fettsäuresynthetase aus S.cerevisiae, die als typisch eukaryontischer FAS-Vertreter für die Klassifizierung der C.cohnii-FAS als Vergleich herangezogen wurde, wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit ein neues Reinigungsverfahren entwickelt, dessen Vorzüge gegenüber den herkömmlichen Isolierungsmethoden eingehend diskutiert werden.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

ACKMAN,R.G., TOCHER,C.S. & McLACHLAN,J. (1968)
J. Fish. Res. Board Can. 25, 1603-1620

ACKMAN,R.G., HOOPER,S.N. & FRAIR, W. (1971)
Comp. Biochem. Physiol. 40, 931-44

AEBERHARD,E. & MENKES,J.H. (1968)
J. Biol. Chem. 243, 3834-3840

AGRADI,E. & SMITH,S. (1976)
Int. J. Biochem. 7, 467-472

ALIHAUD,G.P., VAGELOS,P.R. & GOLDFINE, H. (1967)
J. Biol. Chem. 242, 4459-4465

ALLEN,J.R., ROBERTS,T.M., LOEBLICH,A.R.,III., & KLOTZ,L.C. (1975) Cell 6, 161-169

ARNSTADT,K.-I., SCHINDLBECK,G. & LYNEN,F. (1975)
Eur. J. Biochem. 55, 561-571

ARSLANIAN,M.J. & WAKIL,S.J. (1975)
in Methods in Enzymology, Vol. XXXV (S.P. COLOWICK & N.O. KAPLAN, eds.), 59-65; Academic Press, New York

ARSLANIAN,M.J., STOOPS,J.K., OH,Y.H. & WAKIL,S.J. (1976)
J. Biol. Chem. 251, 3194-3196

BARNES,E.M.,jr. (1975)
in Methods in Enzymology, Vol. XXXV, 102-109

BARRON,E.J. (1966)
Biochim. Biophys. Acta 116, 425-440

BEACH,D.H. (1972)
J. Am. Oil Chem. Soc. 49, 302A

BEACH,D.H. & HOLZ,G.G.,jr. (1973)
Biochim. Biophys. Acta 316, 56-65

BEACH,D.H., HARRINGTON,G.W., GELLERMAN,J.L., SCHLENK,H. & HOLZ,G.G.,jr. (1974)
Biochim. Biophys. Acta 369, 16-24

BEAM,C.A. & HIMES,M. (1974)
Nature 250, 435-436

BEAM,C.A., HIMES,M., HIMELFARB,J., LINK,C. & SHAW,K. (1977)
Genetics 87, 19-32

BERNERT,J.T.,jr. & SPRECHER,H. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 6736-6744

BERNERT,J.T.,jr. & SPRECHER,H. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 11584-11590

BIO·RAD Technical Bulletin, Nr. 1063E (April 1978),
BIO:RAD GmbH, München

BLIGH,E.G. & DYER,W.J. (1959)
Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917

BLOCH,K. (1969)
Acc. Chem. Res. 2, 193-202

BLOCH,K. (1975)
in Methods in Enzymology, Vol. XXXV, 84-90

BLOCH,K. (1977)
in "Advances in Enzymology and Related Areas of
Molecular Biology" (A. MEISTER, ed.), Vol. 45, 1-84

BLOCH,K. & VANCE,D. (1977)
Ann. Rev. Biochem. 46, 263-298

BODANSKY,S., MINTZ,L.B. & HOLMES,D.S. (1979)
Biochem. Biophys. Res. Commum. 88, 1329-1336

BOLTON,P. & HARWOOD,J.L. (1977)
Biochem. J. 168, 261-269

BOURRE,J.M., POLLET,S., DAUDU,O. & BAUMANN,N. (1971)
C.R. Acad. Sci. Ser. D 273, 1534-1537

BOURRE,J.M., POLLET,S., CHAIX,G., DAUDU,O. &
BAUMANN,N. (1973)
Biochimie 55, 1473-1479

BRADY,R.O. (1958)
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 44, 993-998

BRADY,R.O. & GURIN,S. (1952)
J. Biol. Chem. 199, 421

BRATCHER,S.C. & HSU,R.Y. (1975)
Biochim. Biophys. Acta 410, 229-235

BRENNER,R.R. (1977)
Adv. Exp. Med. Biol. 83, 85-101

BRESSLER,R. & WAKIL,S.J. (1961)
J. Biol. Chem. 236, 1643-1651

BRINDLEY,D.N., MATSUMARA,S. & BLOCH,K. (1969)
Nature 224, 666-669

BROOKS,J.L. & STUMPF,P.K. (1965)
Biochim. Biophys. Acta 98, 213-216

BROOKS,J.L. & STUMPF,P.K. (1966)
Arch. Biochem. Biophys. 116, 108-116

BUCKNER,J.S. & KOLATTUKUDY,P.E. (1976)
Biochemistry 15, 1948-1957

BURKL,G., CASTORPH,H. & SCHWEIZER,E. (1972)
Molec. Gen. Genetics 119, 315-322

BURTON,D.N., HAAVIK, A.G. & PORTER,J.W. (1968)
Arch. Biochem. Biophys. 126, 141-154

BUTTERWORTH,P.H.W. & BLOCH,K. (1970)
Eur. J. Biochem. 12, 496-501

CAREY,E.M. & DILS,R. (1970)
Biochim. Biophys. Acta 210, 371-387

CHATTERJEE,D., REDDY,K.V.S. & RAY,T.K. (1979)
Trends in Biochem. Sci. (TIBS) Vol. 4/12, 278-280

CHRISTIE,W.W. (1972)
in "Topics in Lipid Chemistry" (F.D. GUNSTONE, ed.)
Vol. 3, 171-197; Logos-Press, London

CLEMENTS,P.R., BARDEN,R.E., AHMAD,P.M. & AHMAD,F. (1979)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 86, 278-284

COLLI,W., HINKLE,P.C. & PULLMANN,M.W. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 6432-6443

DAILEY,H.A. & STRITTMATTER,P. (1978)
J. Biol. Chem. 253, 8203-8209

DAILEY,H.A. & STRITTMATTER,P. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 5388-5396

DAILEY,H.A. & STRITTMATTER,P. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 5184-5189

DARNALL,D.W. & KLOTZ,I.M. (1975)
Arch. Biochem. Biophys. 166, 651-682

DELO,J., ERNST-FONBERG,M.L. & BLOCH,K. (1971)
Arch. Biochem. Biophys. 143, 384-391

DEMASSIEUX,S. & LACHANCE,J.P. (1974)
Biochim. Biophys. Acta 348, 94-114

DILEEPAN,K.N., LIN,C.Y. & SMITH,S. (1978)
Biochem. J. 175, 199-206

DILS,R. & CAREY,E.M. (1975)
in Methods in Enzymology, Vol. XXXV, 74-83

DINELLO,R.K. & ERNST-FONBERG,M.L. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 1707-1711

DITURI,F. & GURIN,S. (1953)
Arch. Biochem. Biophys. 43, 231

DODGE,J.D. (1965)
Exc. Med. Int. Congr. Ser. 91, 339

DODGE,J.D. (1966)
in "The Chromosomes of the Algae" (GODWARD,M.B.E., ed.), 96-115; St. Martin's Press, New York

DONALDSON,W.E., WIT-PEETERS,E.M. & SCHOLTE,H.R. (1970)
Biochim. Biophys. Acta 202, 35-42

DUNHAM,J.E., HARRINGTON,G.W. & HOLZ,G.G.,jr. (1966)
Biol. Bull. 131, 389

DUTLER,H., COON,M.J., KULL,A., VOGEL,H., WALDVOGEL,G. & PRELOG,V. (1971)
Eur. J. Biochem. 22, 203-212

EASTER,D.J. & DILS,R. (1968)
Biochim. Biophys. Acta 152, 653-668

EGGERER,H. & LYNEN,F. (1962)
Biochem. Z. 335, 540-547

ELOVSON,J. (1975)
J. Bacteriol. 124, 524-533

ENOCH,H.G., CATALA,A. & STRITTMATTER,P. (1976)
J. Biol. Chem. 251, 5095-5103

ENSINCK,J.W., SHEPARD,C., DUDL,R.J. & WILLIAMS,R.H. (1972)
J. Clin. Endocrinol. Metab. 35, 463-467

ERNST-FONBERG,M.L. (1973)
Biochemistry 12, 2449-2455

ERNST-FONBERG,M.L. & BLOCH,K. (1971)
Arch. Biochem. Biophys. 143, 392-400

ERNST-FONBERG,M.L., DUBINSKAS,F. & JONAK,Z.L. (1974)
Arch. Biochem. Biophys. 165, 646-655

ERNST-FONBERG,M.L., SCHONGALLA,A.W. & WALKER,T.A. (1977)
Arch. Biochem. Biophys. 178, 166-173

FAHRNEY,D.E. & GOLD,A.M. (1963)
J. Am. Chem. Soc. 85, 997-1000

FORMICA,J.V. & BRADY,R.O. (1959)
J. Am. Chem. Soc. 81, 752

FRANKER,C.K. (1972)
J. Phycol. 8, 264-268

FRANKER,C.K., SMITH,L.F. & SAKHRANI,I.M. (1973)
Arch. f. Mikrobiol. 90, 255-262

GAVILANES,J., LIZARBE,M.A., MUNICIO,A.M., RAMOS,J.A. & RELANO,E. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 4015-4021

GIBSON,D.M., TITCHENER,E.B. & WAKIL,S.J. (1958a)
J. Am. Chem. Soc. 80, 2908

GIBSON,D.M., TITCHENER,E.B. & WAKIL,S.J. (1958b)
Biochim. Biophys. Acta 30, 376-383

GIOMPRES,P. & PACKTER,N.M. (1978)
Biochim. Biophys. Acta 529, 189-200

GOLDBERG,A.L. (1971)
Nature New Biol. 234, 51-52

GOLDBERG,I. & BLOCH,K. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 7349-7357

GOLDBERG,I. & BLOCH,K. (1977) unpublished:
zitiert aus BLOCH,K. & VANCE,D. (1977),
Ann. Rev. Biochem. 46, 263-298 ; S. 272

GOLDBERG,I., SHECHTER,I. & BLOCH,K. (1973)
Science 182, 497-499

GOLDMAN,P. & VAGELOS,P.R. (1962)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 414-418

GOLDMAN,P. & ALBERTS,A.W. & VAGELOS,P.R. (1963)
J. Biol. Chem. 238, 1255-1261

GRUNNET,I. & KNUDSEN,J. (1978)
Biochem. J. 173, 929-933

GUCHHAIT,R.B., PUTZ,G.R. & PORTER,J.W. (1966)
Arch. Biochem. Biophys. 117, 541-549

GUY,P., LAW,S. & HARDIE,G. (1978)
FEBS Letters 94, 33-37

HAMKALO,B. & RATTNER,J.B. (1977)
Chromosoma 60, 39-47

HANSEN,H.J.M., CAREY,E.M. & DILS,R. (1970)
Biochim. Biophys. Acta 210, 400-410

HANSEN,H.J.M., CAREY,E.M. & DILS,R. (1971)
Biochim. Biophys. Acta 248, 391-405

HARDIE,D.G. & COHEN,P. (1978)
Eur. J. Biochem. 92, 25-34

HARLAN,W.R. & WAKIL,S.J. (1963)
J. Biol. Chem. 238, 3216-3223

HARRINGTON,G.W. & HOLZ,G.G.,jr. (1968)
Biochim. Biophys. Acta 164, 137-139

HARRINGTON,G.W., BEACH,D.H. & HOLZ,G.G.,jr. (1970)
J. Protozool. 17, 213-219

HARWOOD,J.L. (1975)
in "Recent Advances in the Chemistry and Biochemistry of Plant Lipids" (GALLIARD,T. & MERCER,E.I., eds.), 43-93, Acad. Press, London

HARWOOD,J.L. & STUMPF,P.K. (1972)
Arch. Biochem. Biophys. 148, 282-290

HARWOOD,J.L. & STUMPF,P.K. (1976)
in Trends in Biochem. Sci. (TIBS) Vol. 1/11, 253-256

HATHAWAY,D.R. & ADELSTEIN,R.S. (1979)
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76, 1653-1657

HEIL,A. & ZILLIG,W. (1970)
FEBS Letters 11, 165-168

HENDREN,R.W. & BLOCH,K. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 1504-1508

HIMES,M. & BEAM,C.A. (1975)
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 72, 4546-4549

HOLLOWAY,P.W. (1971)
Biochemistry 10, 1556-1560

HOLTERMÜLLER,K.-H., RINGELMANN,E. & LYNEN,F. (1970)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 1411-1422

HOWARD,C.F.,jr. (1968)
J. Lip. Res. 9, 254-261

HSU,R.Y. & YUN,S.-L. (1970)
Biochem. 9, 239-245

HSU,R.Y., WASSON,G. & PORTER,J.W. (1965)
J. Biol. Chem. 240, 3736-3746

HSU,R.Y., BUTTERWORTH,P.H.W. & PORTER,J.W. (1969)
Methods in Enzymology, Vol. XIV, 33-39

ISHIDA,Y. (1968)
Mem. Res. Inst. Food Sci., Kyoto Univ. 9[illegible] 48-82

ISHIDA,Y. & KADOTA,H. (1965)
Mem. Res. Inst. Food Sci., Kyoto [illegible]v. 26, 17

ISHIDA,Y. & KADOTA,H. (1967)
Ag. Biol. Chem. 31, 756-757

JACOBSON,B.S., KANNANGARA,C.G. & STUMPF,P.K. (1973a)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 51, 487-493

JACOBSON,B.S., KANNANGARA, C.G. & STUMPF,P.K. (1973b)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 1190-1198

JAMES,A.T. (1977)
Adv. Exp. Med. Biol. 83, 51-74

JAVORNICKY,P. (1962)
Preslia 34, 98-113

JEFFCOAT,R. (1977)
Biochem. Soc. Trans. 5, 811-818

JEFFCOAT,R. (1979)
in Essays in Biochemistry (P.N. CAMPBELL & F. DICKENS, eds.), Vol. 15, 1-36; Acad. Press, London

JEFFCOAT,R., BRAWN,P.R., SAFFORD,R. & JAMES,A.T. (1977)
Biochem. J. 161, 431-437

JEFFCOATE,S.L. & WHITE,N. (1974)
J. Clin. Endocrinol. Metab. 38, 155-157

JOSEPH,J.D. (1975)
Lipids 10, 395-403

KADOTA,H. & ISHIDA,Y. (1968)
Bull. Misaki Mar. Biol. Inst., Kyoto Univ., 12, 35-48

KANNANGARA,C.G. & STUMPF,P.K. (1972)
Arch. Biochem. Biophys. 148, 414-424

KANNANGARA,C.G., JACOBSON,B.S. & STUMPF,P.K. (1973)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 648-655

KATES,M. (1972)
"Techniques in Lipidology", in Laboratory Techniques in Biochemistry an Molecular Biology (T.S. WORK & E. WORK, eds.), S. 351; North-Holland Publ. Comp., Amsterdam

KATIYAR,S.S. & PORTER,J.W. (1977)
Life Sciences 20, 737-760

KATIYAR,S.S., BRIEDIS,A.V. & PORTER,J.W. (1974)
Arch. Biochem. Biophys. 162, 412-420

KAWAGUCHI,A. & OKUDA,S. (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 74, 3180-3183

KAWAGUCHI,A., TOMODA,H., OKUDA,S., AWAYA,J. & OMURA,S. (1979)
Arch. Biochem. Biophys. 197, 30-35

KELLER,S.E., HUTNER,S.H. & KELLER,D.E. (1968)
J. Protozool. 15, 792-795

KEYES,S.R., ALFANO,J.A., JANSSON,I. & CINTI,D.L. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 7778-7784

KHAN,A.A. & KOLATTUKUDY,P.E. (1973)
Arch. Biochem. Biophys. 158, 411-420

KIM,I.-C., UNKEFER,C.J. & DEAL,W.C.,jr. (1977)
Arch. Biochem. Biophys. 178, 475-485

KINSELLA,J.E., BRUNS,D. & INFANTE,J.P. (1975)
Lipids 10, 227-236

KIRSCHNER,K. (1963)
Sonderheft "Fettransport und Fettverwertung nach oraler und intravenöser Fettzufuhr" aus Medizin und Ernährung, 31-34; Lochham, 1963

KLEINIG,H. & LIEDVOGEL,B. (1978)
Eur. J. Biochem. 83, 499-505

KNOBLING,A. SCHIFFMANN,D. SICKINGER,H.-D. & SCHWEIZER,E. (1975)
Eur. J. Biochem. 56, 359-367

KNOCHE,H.W. & KOTHS,K.E. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 3517-3519

KNUDSEN,J. (1972)
Biochim. Biophys. Acta 280, 408-414

KNUDSEN,J. (1979)
Biochem. J. 181, 267-274

KNUDSEN,J. & DILS,R. (1975)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 63, 780-785

KNUDSEN,J., CLARK,S. & DILS,R. (1976)
Biochem. J. 160, 683-691

KOEPPEN,A.H., BARRON,K.D. & MITZEN,E.J. (1973)
Biochemistry 12, 276-281

KOLATTUKUDY,P.E., BUCKNER,J.S. & BEDORD,C.J. (1976)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 379-385

KRESZE,G.-B., OESTERHELT,D., LYNEN,F., CASTORPH,H. & SCHWEIZER,E. (1976)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 893-899

KUBAI,D.F. & RIS,H. (1969)
J. Cell Biol. 40, 508-528

KÜHN,L., CASTORPH,H. & SCHWEIZER,E. (1972)
Eur. J. Biochem. 24, 492-497

KUMAR,S., PHILLIPS,G.T. & PORTER,J.W. (1972)
Int. J. Biochem. 3, 15-32

KUNAU,W.-H. (1976)
Angew. Chemie 88, 97-111

LÄMMLI,U.K. (1970)
Nature New. Biol. 227, 680-685

LANDRISCINA,C., GNONI,G.V. & QUAGLIARIELLO,E. (1970)
Biochim. Biophys. Acta 202, 405-414

LAYNE,E. (1957)
in Methods in Enzymology, Vol. III, 447-454

LENNARZ,W.J., LIGHT,R.J. & BLOCH,K. (1962)
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 48, 840-845

LIBERTINI,L.J. & SMITH,S. (1978)
J. Biol. Chem. 253, 1393-1401

LIBERTINI,L.J. & SMITH,S. (1979)
Arch. Biochem. Biophys. 192, 47-60

LINN,T.C. & SRERE,P.A. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 10676-10680

LINN,T.C., STARK,M.J. & SRERE,P.A. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 1388-1392

LOEBLICH,A.R.,III. (1976)
J.Protozool. 23, 13-28

LORNITZO,F.A., QURESHI,A.A. & PORTER,J.W (1974)
J. Biol. Chem. 249, 1654-1656

LORNITZO,F.A., QURESHI,A.A. & PORTER,J.W. (1975)
J. Biol. Chem. 250, 4520-4529

LYNEN,F. (1952/53)
Harvey Lectures 48, 210-244

LYNEN,F. (1955)
Angew. Chemie 67, 463-470

LYNEN,F. (1959)
J. Cell. Comp. Physiol. 54, Suppl. 1, 33-49

LYNEN,F. (1961)
Fed. Proc. 20, 941-951

LYNEN,F. (1967)
in Progress Biochem. Pharmacol. (D. KRITCHEVSKY, R. PAOLETTI & M.D. STEINBERG, eds.) Vol. 3, 1-31

LYNEN,F. (1968)
in "Aspekts of Yeast Metabolism" (A.K. MILLS, ed.), 271-302; Blochwell Scientific Publ.

LYNEN,F. (1969)
in Methods in Enzymology, Vol. XIV, 17-33

LYNEN,F. (1970)
in "Homologies in Enzymes and Metabolic Pathways and Metabolic Alterations in Cancer" (W.J. WHELAN & J. SCHULTZ, eds.), 151-175; North-Holland Publ. Comp., Amsterdam

LYNEN,F. (1972)
in "Molecular Bioenergetics and Macromolecular Biochemistry" (H.H. WEBER, ed.), 30-55; Springer Verlag, Berlin

LYNEN,F. & OCHOA,S. (1953)
Biochim. Biophys. Acta 12, 299-314

LYNEN,F., REICHERT,E. & RUEFF,L. (1951)
Liebigs Ann. Chem. 574, 1-31

LYNEN,F., WESSELY,L., WIELAND,O. & RUEFF,L. (1952)
Angew. Chemie 64, 687

LYNEN,F., MATSUHASHI,M., NUMA,S. & SCHWEIZER,E. (1963)
in "The Control of Lipid Metabolism", Biochem. Soc. Symp. 24 (J.K. GRANT, ed.), S. 43; Acad. Press, New York

LYNEN,F., HOPPER-KESSEL,I. & EGGERER,H. (1964)
Biochem. Z. 340, 95-124

MAITRA,S.K. & KUMAR,S. (1974)
J. Biol. Chem. 249, 118-125

MAJERUS,P.W., ALBERTS,A.W. & VAGELOS,P.R. (1964)
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 51, 1231-1238

MAJERUS,P.W., ALBERTS,A.W. & VAGELOS,P.R. (1965)
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 53, 410-417

MARGOLIS,S. & BAUM,H. (1966)
Arch. Biochem. Biophys. 114, 445-451

MARTIN,R.G. & AMES,B.N. (1961)
J. Biol. Chem. 236, 1372-1379

MARTIN,D.B. & VAGELOS,P.R. (1962)
J. Biol. Chem. 237, 1787-1792

MATSUMARA,S. (1970)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 238-243

MATSUMARA,S. BRINDLEY,D.N. & BLOCH,K. (1970)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 369-377

MAZLIAK,P. (1973)
Ann. Rev. Plant Physiol. 24, 287-310

MEYER,K.-H. & SCHWEIZER,E. (1976)
Eur. J. Biochem. 65, 317-324

MOROT-GAUDRY,Y. & DIEBLER,M.-F. (1979)
Biochem. J. 180, 297-301

MUESING,R.A. & PORTER,J.W. (1975)
in Methods in Enzymology, Vol. XXXV, 45-59

MUNICIO,A.M., LIZARBE,M.A., RELANO,E. & RAMOS,J.A. (1977)
Biochim. Biophys. Acta 487, 175-188

MURPHY,J.B. & KIES,M.W. (1960)
Biochim. Biophys. Acta 45, 382-384

NAGAI,J. & BLOCH,K. (1966)
J. Biol. Chem. 241, 1925-1927

NANDEDKAR,A.K.N., SCHIRMER,E.W., PYNADATH,T.I. & KUMAR,S. (1969)
Arch. Biochem. Biophys. 134, 554-562

NEPOKROEFF,C.M., LAKSHMANAN,M.R. & PORTER,J.W. (1975)
in . Methods in Enzymology, Vol. XXXV, 37-44

NOTHELFER,H.G., BARCKHAUS,R.H. & SPENER,F. (1977)
Biochim. Biophys. Acta 489, 370-380

NOYES,E.B. & BRADSHAW,R.A. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 3052-3059

NUGTEREN,D.H. (1965)
Biochim. Biophys. Acta 106, 280-290

OHLROGGE,J.B., KUHN,D.N. & STUMPF,P.K. (1979)
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76, 1194-1198

OKAYASU,T., NAGAO,M. & IMAI,Y. (1979)
FEBS Letters 104, 241-243

OKUDA,T. MIHARA,K. & SATO,R. (1972)
J. Biochem. (Tokyo) 72, 987-992

OSHINO,N., IMAI,Y. & SATO,R. (1971)
J. Biochem. (Tokyo) 69, 155-167

OVERATH,P. & STUMPF,P.K. (1964)
J. Biol. Chem. 239, 4103-4110

PACKTER,N.M. & ALAM,A. (1980)
Biochim. Biophys. Acta 615, 497-508

PALTAUF,F. (1978)
Eur. J. Biochem. 85, 263-270

PASKIN,N. & MAYER,R.J. (1976)
Biochem. J. 159, 181-184

PATTON,S., FULLER,G., LOEBLICH,A.R.,III. & BENSON,A.A. (1966) Biochim. Biophys. Acta 116, 577-579

PATTON,S., CHANDLER,P.T., KALAN,E.B., LOEBLICH,A.R.,III., FULLER,G. & BENSON,A.A. (1967)
Science 158, 789-790

PODACK,E.R. (1971)
Dissertation, Universität Göttingen

PODACK,E.R., LAKOMEK,M., SAATHOFF,G. & SEUBERT,W. (1974a)
Eur. J. Biochem. 45, 13-23

PODACK,E.R., SAATHOFF,G. & SEUBERT,W. (1974b)
Eur. J. Biochem. 50, 237-243

POLLET,S., BOURRE,J.M. & BAUMANN,N. (1969)
C.R. Acad. Sci. Ser. D 268, 2146-2149

POPJÂK,G. & TIETZ,A. (1954)
Biochem. J. 56, 46-53

POPJÂK,G. & TIETZ,A. (1955)
Biochem. J. 60, 147-155

PORRA,R.J. & STUMPF,P.K. (1976)
Arch. Biochem. Biophys. 176, 53-62

PORTER,J.W., WAKIL,S.J., TIETZ,A., JACOB,M.I. &
GIBSON,D.M. (1957)
Biochim. Biophys. Acta 25, 35-41

POULOSE,A.J. & KOLATTUKUDY,P.E. (1980a)
Arch. Biochem. Biophys. 199, 457-464

POULOSE,A.J. & KOLATTUKUDY,P.E. (1980b)
Arch. Biochem. Biophys. 201, 313-321

PRASAD,M.R. & JOSHI,V.C. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 6362-6369

PRASAD,M.R., SREEKRISHNA,K. & JOSHI,V.C. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 2583-2589

PRESCOTT,D.J. & VAGELOS,P.R. (1972)
Advan. Enzymol. 36, 269-311

PROUTY,W.F. & GOLDBERG,A.L. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 3341-3352

PROVASOLI.L. & GOLD,K. (1962)
Arch. f. Mikrobiol. 42, 196-203

PUGH,E.L., SAUER,F., WAITE,M., TOOMEY,R.E. & WAKIL,S.J.
(1966) J. Biol. Chem. 241, 2635-2643

QUINN,P.J. & WILLIAMS,W.P. (1978)
Progr. Biophys. Molec. Biol. 34, 109-173

QURESHI,A.A., LORNITZO,F.A., JENIK,R.A. & PORTER,J.W. (1976a) Arch. Biochem. Biophys. 177, 364-378

QURESHI,A.A., LORNITZO,F.A., HSU,R.Y. & PORTER,J.W. (1976b) Arch. Biochem. Biophys. 177, 379-393

RAE,P.M.M. (1973)
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 70, 1141-1145

RAE,P.M.M. & STEELE,R.E. (1978)
BioSystems 10, 37-53

REIJNIERSE,G.L.A., VELDSTRA,H. & VAN DEN BERG,C.J. (1975)
Biochem. J. 152, 477-484

RICHARDS,R.L. & QUACKENBUSH,F.W. (1974)
Arch. Biochem. Biophys. 165, 780-786

RIS,H. (1962)
in "Interpretation of Ultrastructure" (HARRIS,R., ed.), S. 69

RIZZO,P.J. & NOODEN,L.D. (1974)
Biochim. Biophys. Acta 349, 402-414

ROGERS,M.J. & STRITTMATTER,P. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 800-806

RONCARI,D.A.K. (1974a)
J. Biol. Chem. 249, 7035-7037

RONCARI,D.A.K. (1974b)
Can. J. Biochem. 52, 221-230

ROSSI,A. & CORCORAN,J.W. (1973)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 50, 597-602

RÜCHEL,R. & GROSS,J. (1979)
Analyt. Biochem. 92, 91-98

RUTKOSKI,A. & JAWORSKI,J.G. (1978)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 84, 428-434

SABAITIS,J.E.,jr. & POWELL,G.L. (1976)
J. Biol. Chem. 251, 4706-4712

SCHUBERTH,J. (1965)
Biochim. Biophys. Acta 98, 1-7

SCHWEIZER,E. (1977)
Naturwiss. 64, 366-370

SCHWEIZER,E. & BOLLING,H. (1970)
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 67, 660-666

SCHWEIZER,E., KÜHN,L. & CASTORPH,H. (1971)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 377-384

SCHWEIZER,E., KNIEP,B., CASTORPH,H. & HOLZNER,U. (1973)
Eur. J. Biochem. 39, 353-362

SCHWEIZER,E., WERKMEISTER,K. & JAIN,M.K. (1978)
Molec. Cell. Biochem. 21, 95-107

SEKAR,V. & HAGEMAN,J.H. (1979)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 89, 474-478

SEUBERT,W. (1970)
Naturwiss. 57, 443-449

SEUBERT,W., GREULL,G. & LYNEN,F. (1957)
Angew. Chemie 69, 359-361

SHAW,R. (1966)
in Advan. Lipid Res. (R. PAOLETTI & D. KRITCHEVSKY, eds.), Vol. 4, 107-174; Acad. Press, New York

SHIMAKATA,T., MIHARA,K. & SATO,R. (1972)
J. Biochem. (Tokyo) 72, 1163-1174

SIMON,E.J. & SHEMIN,D. (1953)
J. Am. Chem. Soc. 75, 2520

SIMONI,R.O., CRIDDLE,R.S. & STUMPF,P.K. (1967)
J. Biol. Chem. 242, 573-581

SINGER,S.J. & NICOLSON,G.L. (1972)
Science 175, 720-731

SIREVÅG,R. & LEVINE,R.P. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 2586-2591

SMITH,S. & ABRAHAM,S. (1970)
J. Biol. Chem. 245, 3209-3217

SMITH,S. & ABRAHAM,S. (1975)
in Methods in Enzymology, Vol. XXXV, 65-74

SMITH,S. & LIBERTINI,L.J. (1979)
Arch. Biochem. Biophys. 196, 88-92

SMITH,S. & STERN,A. (1979)
Arch. Biochem. Biophys. 197, 379-387

SOYER,M.-O. (1978)
BioSystems 10, 55-58

SPATZ, L. & STRITTMATTER,P. (1971)
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 68, 1042-1046

SPATZ,L. & STRITTMATTER,P. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 793-799

SPERLING,J.E., FELDMANN,K., MEYER,H., JAHNKE,U. &
HEILMEYER,L.M.G.,jr. (1979)
Eur. J. Biochem. 101, 581-592

STOFFEL,W. (1966)
Naturwiss. 53, 621-630

STOOPS,J.K. & WAKIL,S.J. (1978)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 84, 225-231

STOOPS,J.K., ARSLANIAN,M.J., OH,Y.H., AUNE,K.C.,
VANAMAN,T.C. & WAKIL,S.J. (1975)
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 72, 1940-1944

STOOPS,J.K., ARSLANIAN,M.J., CHALMERS,J.H.,jr.,
JOSHI,V.C. & WAKIL,S.J. (1977)
in Bioorganic Chemistry (VAN TAMELEN,E.E., ed.),
Vol. 1, 339-370; Acad. Press, New York

STOOPS,J.K., AWAD,E.S., ARSLANIAN,M.J., GUNSBERG,S.,
WAKIL,S.J. & OLIVER,R.M. (1978a)
J. Biol. Chem. 253, 4464-4475

STOOPS,J.K., ARSLANIAN,M.J., AUNE,K.C. & WAKIL,S.J.
(1978b) Arch. Biochem. Biophys. 188, 348-359

STOOPS,J.K., ROSS,P., ARSLANIAN,M.J., AUNE,K.C.,
WAKIL,S.J. & OLIVER,R.M. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 7418-7426

STRITTMATTER,P., SPATZ,L., CORCORAN,D., ROGERS,M.J.,
SETLOW,B. & REDLINE,R. (1974)
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 71, 4565-4569

STRONG,C.R. & DILS,R. (1972)
Int. J. Biochem. 3, 369-377

STUDIER,F.W. (1973)
J. Mol. Biol. 79, 237-248

STUMPF,P.K. (1975)
in "Recent Advances in the Chemistry and Biochemistry of Plant Lipids" (T. GALLIARD & E.I. MERCER, eds.), 95-113; Acad. Press, London

SUMPER,M., OESTERHELT,D., RIEPERTINGER,C. & Lynen,F. (1969)
Eur. J. Biochem. 10, 377-387

TAURO,P., HOLZNER,U., CASTORPH,H., HILL,F. & SCHWEIZER,E. (1974)
Molec. Gen. Genetics 129, 131-148

TENCATI,J.R. & ROSENBERG,R.N. (1973)
Biochim. Biophys. Acta 293, 542-551

TUCEK,S. (1970)
in "Drugs and Cholinergic Mechanisms in the Central Nervous System" (HEILBRONN,E. & WINTER,A., eds.), 117-131; Försvarets Forkningsanstalt, Stockholm

TUTTLE,R.C. & LOEBLICH,A.R.,III. (1975)
Phycologia 14, 1-8

VAGELOS,P.R. (1971)
in "Current Topics in Cellular Regulation" (B.L. HORECKER & E.R. STADTMAN, eds.), 119-166; Acad. Press, New York

VAGELOS,P.R., ALBERTS,A.W. & MARTIN,D.B. (1963)
J. Biol. Chem. 238, 533-540

VANAMAN,T.C., WAKIL,S.J. & HILL,R.L. (1968a)
J. Biol. Chem. 243, 6409-6419

VANAMAN,T.C., WAKIL,S.J. & HILL,R.L. (1968b)
J. Biol. Chem. 243, 6420-6431

VANCE,D.E., MITSUHASHI,O. & BLOCH,K. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 2303-2309

VICK,B. & BEEVERS,H. (1978)
Plant Physiol. 62, 173-178

VOLPE,J.J. & VAGELOS,P.R. (1976)
Physiol. Revs. 56, 339-417

WAITE,M. & WAKIL,S.J. (1962)
J. Biol. Chem. 237, 2750-2757

WAITE,M. & WAKIL,S.J. (1963)
J. Biol. Chem. 238, 77-80

WAKIL,S.J. (1958)
J. Am. Chem. Soc. 80, 6465

WAKIL,S.J. (1970)
in "Lipid Metabolism" (S.J. WAKIL, ed.), 1-48;
Acad. Press, New York

WAKIL,S.J. & GANGULY,J. (1959)
J. Am. Chem. Soc. 81, 2597-2598

WAKIL,S.J., PORTER,J.W. & GIBSON,D.M. (1957)
Biochim. Biophys. Acta 24, 453-461

WAKIL,S.J., TITCHENER,E.B. & GIBSON,D.M. (1958)
Biochim. Biophys. Acta 29, 225-226

WAKIL,S.J., McLAIN,L.W. & WARSHAW,J.B. (1960)
J. Biol. Chem. 235, PC 31-32

WARBURG,O. & CHRISTIAN,W. (1941)
Biochem. Z. 310, 384-421

WEAIRE,P.J. & KEKWICK,R.G.O. (1975a)
Biochem. J. 146, 425-437

WEAIRE,P.J. & KEKWICK,R.G.O. (1975b)
Biochem. J. 146, 439-445

WERNER-SCHLENZKA,H., WERNER,E. & KRÖGER,H. (1978)
Comp. Biochem. Physiol. 61B, 587-591

WHITE,H.B.,III., MITSUHASHI,O. & BLOCH,K. (1971)
J. Biol. Chem. 246, 4751-4754

WIELAND,F., RENNER,L., VERFÜRTH,C. & LYNEN,F. (1979)
Eur. J. Biochem. 94, 189-197

WILLECKE,K., RITTER,E. & LYNEN,F. (1969)
Eur. J. Biochem. 8, 503-509

WOOD,W.I. (1976)
Analyt. Biochem. 73, 250-257

WOOD,W.I., PETERSON,D.O. & BLOCH,K. (1978)
J. Biol. Chem. 253, 2650-2656

YANG,S.F. & STUMPF,P.K. (1965)
Biochim. Biophys. Acta 98, 19-26

YANG,P.C., BUTTERWORTH,P.H.W., BOCK,R.M. &
PORTER,J.W. (1967)
J. Biol. Chem. 242, 3501-3507

YUN,S.-L. & HSU,R.Y. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 2689-2698

ZAKIM,D. & HERMAN,R.H. (1969)
Am J. Clin. Nutr. 22, 200-213

Für das Zustandekommen der vorliegenden Arbeit
bin ich zu besonderem Dank verpflichtet:

Herrn Prof. Dr. W.-H. Kunau für die Überlassung
des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes
und seine ständige Diskussionsbereitschaft,

Herrn Prof. Dr.W. Hengstenberg für die Übernahme
des Koreferates,

Frau Prof. Dr. M. von Düring für die Anfertigung
der elektronenmikroskopischen Aufnahmen,

allen Mitarbeitern des Instituts für Physiologische
Chemie, Lehrstühle I und II, vor allem den Mitglie-
dern der Arbeitsgruppe für Bioorganische Chemie für
freundliche Unterstützung und hilfreiche Diskussionen.

L E B E N S L A U F

1.11.1950	Geboren als Sohn des Journalisten Rolf-Albert Sonnenborn und seiner Frau Herta, geb. Hase, in Berleburg, Kreis Wittgenstein
25.4.1957	Einschulung in die Ev. Volksschule Darler Heide in Gelsenkirchen-Erle
1957 - 1961	Besuch von Volksschulen in Gelsenkirchen und in Hamm/Westf.
April 1961 - Juni 1969	Besuch des Städtischen Neusprachlichen Gymnasiums in Hamm/Westf.
6.6.1969	Ablegung der Reifeprüfung
Oktober 1971	Aufnahme des Studiums der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
Oktober 1973	Ablegung der Diplom-Vorprüfung
März 1976	Ablegung des mündlichen Teils der Diplom-Hauptprüfung
Juni 1976 - Juni 1977	Anfertigung der Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen (Arbeitsgruppe Molekulare Genetik) der Ruhr-Universität Bochum mit dem Titel: "Versuche zur Isolation einer RNA-Polymerase-Bindestelle aus Eco·RI-Restriktionsfragmenten der DNA des Bakteriophagen T4"
Juni 1977 - Oktober 1980	Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit am Lehrstuhl für Physiologische Chemie, Arbeitsgruppe Bioorganische Chemie, der Ruhr-Universität Bochum